

Aus den Instituten für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
in Zusammenarbeit mit der
Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin
des Zentrums für Zahnmedizin
Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Konzentration Lektin-spezifischer Speichelglykane im Verlauf einer experimentellen Gingivitis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Frau Jessica Drews
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. A. Kage

2. Prof. Dr. Dr. L. Stöber

3. Prof. Dr. M. Hannig

Datum der Promotion: 27. Oktober 2005

meinen Eltern

Abstract – Deutsch –

Schlagwörter: Speichel

drüsenspezifisch

experimentelle Gingivitis

Lektine

Glykanstrukturen

Speichelglykane können einerseits spezifisch an bakterielle Lektine binden und damit deren Adhäsion an orale Oberflächen vermitteln, andererseits eine Antiadhäsion bedingen. Sie stellen ein Schutzsystem für orale Oberflächen dar. Bei vorhandener Karies bzw. Parodontitis ist die Konzentration bestimmter Glykokonjugate verändert. Ziel dieser Studie war es, die Reaktivität der Glandulae majores bzgl. ihrer Sekretion von Glykanen in Abhängigkeit einer experimentellen Gingivitis zu ermitteln. 14 gesunde Probanden enthielten sich 9 Tage der Mundhygiene. Neben der Erhebung des PBI und QH wurde drüsenspezifischer Speichel gewonnen. Die Konzentrationen an die Lektine 'PNA', 'GS1', 'VVA', 'SNA' und 'AAA' bindender Komponenten und deren drüsenspezifische Sekretionsraten wurden bestimmt. Bei allen Probanden stiegen PBI und QH im Versuchsverlauf signifikant an. Gleiches galt für die Speichelmenge nach Stimulation sowie zum Ende der Kontrollreihe. Die Konzentrationen der verschiedenen Glykane verhielten sich unabhängig von der Speichelmenge und unabhängig voneinander. Meist ergab sich eine erhöhte Glykansekretion spezifisch für das untersuchte Lektin. Neben dem Konzentrationsgefälle der einzelnen Drüsen war auch eine Verschiebung nach erfolgter Stimulation zu beobachten. Da genetische und externe Einflüsse für diese Studie weitgehend ausgeschlossen werden konnten bzw. als konstant einzuordnen waren, darf die Veränderung als Reaktion auf die orale Bakterienbelastung angesehen werden. Der Rückgang bestimmter terminaler Strukturen könnte als Folge der vermehrten Synthese anderer, in Bezug auf die veränderte Bakterienflora effektiverer Speichelbestandteile eingeordnet werden. Basierend auf dem Modell, dass freie Glykane die Adhäsion von Mikroorganismen inhibieren können, ließe sich die gemessene Reaktion der Speicheldrüsensekretion als ein gesteigerter Schutzmechanismus im Sinne einer 'first line of defence' interpretieren. Dieser könnte z.B. in Bezug auf Prophylaxe und Therapie genutzt werden.

Abstract – English –

Headwords: saliva

pure glandula saliva

experimental gingivitis

lectins

glycan pattern

Salivary glycans can bind specifically to bacterial lectins. Consequently, bacterial adhesion to oral surfaces is mediated or inhibited by glycans. It is known that the concentration of certain glycans changes in the presence of caries or periodontitis. Therefore this study examines the reactivity of the major salivary glands with respect to the secretion of glycans as conditioned by an experimentally induced gingivitis. 14 healthy subjects refrained from all oral hygiene measures for 9 days. On 5 days a plaque and bleeding index as well as pure glandula saliva with and without stimulation were obtained. The collected salivary samples were examined for their concentration of certain structures that bind to the lectins 'PNA', 'GS1', 'VVA', 'SNA' and 'AAA'. All subjects developed a gingivitis as measured by the plaque and bleeding index. Salivary flow increased after stimulation and compared to baseline at the end of the trial. The concentration of glycans was neither related to one of the glands nor to the salivary flow. Besides to the differentials of concentration after stimulation there was no symmetrical development between the concentrations of salivary lectin-specific components compared one lectin to another. Genetic and external influences could be largely excluded or considered to be stable during the trial. Therefore the observed results can be regarded as a reaction to the increased bacterial load. The decrease of certain terminal structures in saliva might be explained by a raised synthesis of other components, which are more effective in defending the body against bacterial adhesion. The observed changes in salivary secretion might be interpreted as a mechanism in order to protect the human organism within the meaning of a 'first line of defence'. This mechanism would be able to respond more quickly than the immune system and might be used in future, for example, for preventive and therapeutical strategies.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	11
2	EINLEITUNG	13
3	LITERATURÜBERSICHT	15
3.1	ALLGEMEINES.....	15
3.1.1	<i>Mikroorganismen im oralen System.....</i>	<i>15</i>
3.2	ERKRANKUNGEN DER MUNDHÖHLE	15
3.2.1	<i>Ätiologie der Karies</i>	<i>15</i>
3.2.2	<i>Ätiologie der Parodontitis.....</i>	<i>18</i>
3.2.3	<i>Plaque</i>	<i>20</i>
3.3	BAKTERIELLE BINDUNGSMECHANISMEN	23
3.3.1	<i>Lektine</i>	<i>24</i>
3.4	ABWEHRMECHANISMEN DER MUNDHÖHLE	26
3.4.1	<i>Sulkusfluid.....</i>	<i>27</i>
3.4.2	<i>Speicheldrüsen</i>	<i>27</i>
3.4.3	<i>Speichel.....</i>	<i>29</i>
3.5	ZIEL DER UNTERSUCHUNG.....	39
4	MATERIAL UND METHODEN	41
4.1	VORBEREITENDE MAßNAHMEN.....	41
4.1.1	<i>Probandengut.....</i>	<i>41</i>
4.1.2	<i>Eingangsuntersuchung.....</i>	<i>41</i>
4.1.3	<i>Abschlussuntersuchung</i>	<i>41</i>
4.2	KLINISCHER TEIL	41
4.2.1	<i>Bestimmung der Hygienestaten</i>	<i>42</i>
4.2.2	<i>Gewinnung der Speichelproben</i>	<i>44</i>
4.3	LABORTECHNISCHER TEIL	47
4.3.1	<i>Behandlung der Speichelproben</i>	<i>47</i>
4.3.2	<i>Labortechnische Durchführung</i>	<i>47</i>
4.3.3	<i>Statistische Qualitätskontrolle</i>	<i>53</i>
4.4	STATISTISCHER TEIL	53
5	ERGEBNISSE	55
5.1	STRUKTUR DER STICHPROBEN	55
5.2	KLINISCHE BEFUNDE	55
5.2.1	<i>Hygienestaten.....</i>	<i>55</i>
5.2.2	<i>Speichelmengen.....</i>	<i>57</i>
5.3	LABORTECHNISCHE BEFUNDE.....	63

5.3.1	<i>Betrachtung der Speichelkonzentrationen</i>	66
5.3.2	<i>Betrachtung der Sekretionsraten</i>	69
6	DISKUSSION	75
6.1	AUSWAHL DER PROBANDEN	76
6.2	VORBEREITUNG DER PROBANDEN	77
6.3	VALIDITÄT DER UNTERSUCHUNG	78
6.3.1	<i>Validität der klinischen Untersuchung</i>	79
6.3.2	<i>Validität der labortechnischen Untersuchung</i>	79
6.4	METHODIK DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGSPARAMETER.....	80
6.5	METHODIK DER SPEICHELUNTERSUCHUNG.....	81
6.5.1	<i>Methodik der Speichelgewinnung</i>	81
6.5.2	<i>Methodik der Bestimmung der Glykanstrukturen</i>	85
6.6	ERGEBNISSE.....	87
6.6.1	<i>Speichelmenge</i>	87
6.6.2	<i>Glykosylierung</i>	92
6.7	SCHLUSSFOLGERUNG.....	104
6.8	PERSPEKTIVEN	107
7	LITERATURVERZEICHNIS	109
8	ANHANG	139
8.1	MATERIALIEN ZUR KLINISCHEN UNTERSUCHUNG	139
8.2	COMPUTER UND ZUGEHÖRIGE SOFTWARE	139
8.3	LABORMATERIALIEN.....	139
8.3.1	<i>Puffer</i>	140
8.3.2	<i>Lektine</i>	141
8.3.3	<i>Beschichtungen, Standard und Kontrolle</i>	141
8.3.4	<i>Färbung</i>	141
8.4	ABKÜRZUNGEN.....	142
8.5	DANKSAGUNG.....	145
8.6	ERKLÄRUNG	146

2 Einleitung

In den heutigen Industrieländern dominieren zwei Infektionskrankheiten mit oralen Ausprägungen das klinische Bild in der Bevölkerung: Karies und Parodontitis. In den vergangenen Jahrzehnten wurden mehrere Ansatzpunkte gesucht, die eine Senkung der Inzidenz bedingen sollen. Orientiert man sich an dem 1987 von KÖNIG entwickelten Modell, welches der Karies und entsprechend der Parodontitis die ätiologischen Faktoren „Wirt“, „Mikroorganismen“, „Substrat“ und „Zeit“ zu Grunde legt, ergeben sich vier mögliche Wege, auf die Entwicklung dieser beiden Erkrankungen Einfluss zu nehmen. Die individualprophylaktischen karies- und parodontalpräventiven Maßnahmen greifen z.B. über Veränderungen der Faktoren „Zeit“ und „Substrat“ entscheidend in die Mundgesundheit ein. In Bezug auf Karies sind bereits Erfolge im Sinne einer Inzidenzsenkung nachweisbar. Gleiches zeichnet sich jedoch trotz professioneller Präventivmaßnahmen noch nicht für das Krankheitsbild der Parodontitis ab. In Anbetracht des wachsenden Bewusstseins der Bevölkerung für die aktiv beeinflussbare orale Situation ist daher zu vermuten, dass gerade für die Parodontalerkrankungen spezifische und unspezifische Abwehrreaktionen des Körpers, der „Wirt“ selbst, eine ausschlaggebende Rolle spielen.

Mikrobielle Angriffe rufen eine spezifische immunologische Schutzreaktion des Körpers hervor. Vor deren verzögertem Einsetzen bedient der Körper sich einer reflektorischen unspezifischen Abwehr, die grob als ‘first line of defence’ umschrieben wird. Das Ausmaß und die Bedeutung dieses Schutzmechanismus sind in ihrer Gesamtheit noch nicht geklärt. Das Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Campus Virchow-Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin, hat in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Zahnmedizin, Campus Virchow-Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin, bereits Studien zur weiteren Erforschung möglicher Komponenten einer ‘first line of defence’ durchgeführt. Dabei sind Glykokonjugate des Speichels auffällig geworden. Sie sind in der Lage, hochspezifisch über Glykanstrukturen an bestimmte bakterielle Lektine zu binden. Somit ist es möglich, dass deren Adhärenz an Oberflächenstrukturen im Mundraum und die weitere Entstehung von Karies und Parodontopathien behindert wird. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte Konzentration bestimmter Glykanstrukturen bei Personen, die unter einem überdurchschnittlich hohen Kariesbefall bzw. unter Parodontitis leiden.

Vor diesem Hintergrund ergab sich als offene Fragestellung und Ziel der nachfolgenden Untersuchung, in wie weit die Speicheldrüsen durch die quantitativ und qualitativ veränderte Produktion und Sekretion von Glykanen auf eine Zunahme der oralen bakteriellen Belastung reagieren und im Sinne einer ‘first line of defence’ der reflektorischen Schutzreaktion des Körpers dienen.

3 Literaturübersicht

3.1 Allgemeines

3.1.1 Mikroorganismen im oralen System

Unter dem Begriff „Mikroorganismen“ werden Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze zusammengefasst. Sie erfüllen Aufgaben, die nützlicher, schädlicher oder indifferenter Art sind (Lautenbach 1992). In der Medizin nahm KOCH 1890 als erster die Unterscheidung in apathogene und pathogene Mikroorganismen vor (Schlegel 1999). Neben den Mikrobiotopen Haut, Darm, oberer Respirations- und Genitaltrakt sind spezifische Kleinstlebewesen zu einem Anteil von 10^9 Bakterien/ml Speichel auch in der Mundhöhle zu finden (Bowen 1996). Dominierend in ihrer Anzahl sind α -hämolytische Streptokokken, Aktinomyzeten, Bacteroidaceae sowie Mykoplasmen und Spirochäten (Melvin 1991). Ihre Fähigkeit, an Zahn und Mundschleimhautoberflächen zu adhären, stellt eine Grundvoraussetzung für die Etablierung eines pathogenen Biofilms und daraus folgende Dentalerkrankungen dar (Hannig 2001).

3.2 Erkrankungen der Mundhöhle

Mikroorganismen finden im Mundraum geeignete Voraussetzungen in Bezug auf Feuchtigkeit, Temperatur, Kohlendioxidgehalt, pH-Wert und Sauerstoffgehalt, wobei je nach Lokalisation diese Faktoren in ihrem Verhalten differieren. Die Art und Anzahl der Bakterien in der Mundhöhle und ihr Adhärenzverhalten an Zahnoberflächen und Mukosa ist zusammen mit anderen Faktoren prägend für zwei der häufigsten Erkrankungen in den Industrieländern: Karies und Parodontitis.

3.2.1 Ätiologie der Karies

Karies ist ein multikausaler, dynamischer Prozess mit sich abwechselnden Phasen der Demineralisation und Remineralisation. Er führt letztendlich zur Kavitation und Zerstörung der Zahnhartsubstanz. Bereits vor 110 Jahren befasste sich MILLER mit den „Mikroorganismen der Mundhöhle“ in Bezug auf die „Entstehung der Karies“. Obgleich seine These des „chemisch-parasitären Vorgangs“ (Miller 1892) seiner Zeit und bis weit in das 20. Jahrhundert hinein nicht anerkannt war, so bildet sie doch die Grundlage der heute gültigen Kariestheorie. ORLAND et al. bewiesen 1954, dass Karies bei keimfrei gezüchteten Ratten nicht auftritt (Orland et al. 1954). Ein Modell der Ätiologie wurde erst 70 Jahre nach MILLER mit Hilfe von Versuchen an Ratten und Hamstern von KEYES entwickelt. Es stützt sich auf die Infektiosität der Karies und drückt das Zusammenspiel von „Zahn“, „Mikroorganismen“ und „Substrat für die

Mikroorganismen“ aus (Keyes 1960 + 1962). Die momentane schematische Darstellung des Karies-Modells unterscheidet sich nur noch in Bezug auf den von KÖNIG 1987 hinzugefügten Faktor der „Zeit“ (siehe Abbildung 1).

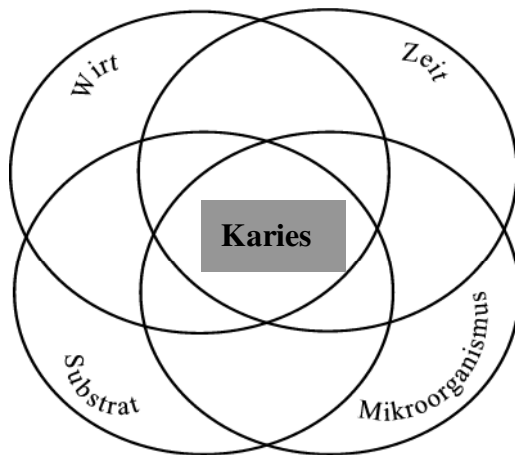


Abbildung 1: schematische Darstellung der Karies-Ätiologie nach KÖNIG 1987

Dieser ist für die Kariesentstehung im gleichen Maße obligat, wie die drei durch KEYES 1960 ermittelten Faktoren „Zahn“, „Mikroorganismen“ und „Substrat für die Mikroorganismen“. Eine Zerstörung der Zahnhartsubstanz ergibt sich erst nach häufigen bzw. langanhaltenden Säureangriffen. Die lokalen und nicht allein die genetischen Einflüsse im Mundraum sind ausschlaggebend für die Entwicklung kariöser Läsionen (König 1995).

Zur Untermauerung des Modells wurden zahlreiche Untersuchungen gemacht. So ergab sich z.B. in Tierexperimenten (Orland et al. 1955, Stephan 1966, Fitzgerald 1968) und in epidemiologischen Studien (Gustafsson et al. 1954, Russel 1963, Newbrun 1982, Sheiham 1983), dass die nahrungsbedingte Aufnahme niedermolekularer Kohlenhydrate mit dem Auftreten von Karies in direktem Zusammenhang steht. Des Weiteren beeinflusst die Konzentration sowie die Konsistenz des Zuckers das kariogene Potential. KÖNIG & MÜHLEMANN belegten 1967, dass die Kariogenität des Zuckers ansteigt, je klebriger und feinkörniger dieser ist. Den Mikroorganismen der Plaque steht demzufolge längere Zeit Substrat zur Verfügung, so dass ein länger andauernder Säureangriff auf die Zähne erfolgt (Stephan 1966, Imfeld 1983). Additiv zeigte GUSTAFSSON 1954 in der „Vipeholm-Studie“, dass nicht nur die zu sich genommene Substratmenge, sondern insbesondere die Frequenz eine wichtige Rolle spielt. Mehrere zuckerhaltige Zwischenmahlzeiten rufen einen erhöhten Karieszuwachs hervor. So sind gerade in den heutigen Industrieländern Warnungen vor der Gefahr durch den frequenten Zuckerkonsum noch heute begründet (Zero 2004).

Letztendlich bestimmt neben der für den Stoffwechsel nötigen enzymatischen Ausstattung der

Bakterien das Ausmaß des speziellen Nahrungsangebotes die Quantität der Bakterien. Initial stammen die meisten Nährstoffe aus dem Speichel, wobei deren Konzentration allerdings sehr gering ist (Carlsson 1980). Darauf folgt die bereits erwähnte bakterielle Aufnahme der niedermolekularen Kohlenhydrate, bevor, wie z.B. in älterer Plaque, eine enge, symbiotische Beziehung der Keime untereinander entsteht. Diese ermöglicht es den Bakterien, die Stoffwechselprodukte anderer bzw. Substrate toter oder lysierter Mikroorganismen zu nutzen (Theilade & Theilade 1970, Carlsson 1989).

Wichtig zu erwähnen ist, dass Mikroorganismen und Substrat allein noch keine Karies verursachen können. Die Bakterien müssen immer in Form von Plaque, eines organisch strukturierten Belages, auf den Zahnoberflächen vorhanden sein. Denn mehrere Studien ergaben (Orland et al. 1954 + 1955, Axelsson & Lindhe 1978), dass Karies ohne Plaque nicht in Erscheinung tritt. Im Übrigen ist neben dem Alter der Plaque auch deren Zusammensetzung für das kariogene Potential entscheidend (Imfeld & Lutz 1980).

3.2.1.1 *Streptococcus mutans*

CLARKE gelang es 1924 Keime aus kariösen Kavitäten im Mundraum zu isolieren. Da bis zu diesem Zeitpunkt elektronenmikroskopisch nur runde Streptokokken bekannt waren, bezeichnete er diese Art aufgrund der ovalen Form als Mutanten: *Streptococcus mutans* (= *S. mutans*). Jahre später wurde erneut dieser Keim beschrieben und mit Hilfe von Tierexperimenten seine besondere Kariogenität bewiesen (Fitzgerald & Keyes 1960, Krasse 1966, Bowen 1968, Keyes 1968). Eine Unterteilung des ursprünglichen *S. mutans* bezüglich seiner immunologischen, biologischen und serologischen Eigenschaften ergab sich dann durch weitere Studien: Benennung von fünf Serotypen a, b, c, d und e (Bratthal 1969 + 1970); Erweiterung um zwei Serotypen f und g (Perch et al. 1974); Identifizierung von vier Genotypen I, II, III und IV (Coykendall 1974) und deren Namensgebung „*Streptococcus mutans*“ (= Serotyp c), „*Streptococcus rattus*“ (= b), „*Streptococcus criceteus*“ (= a) und „*Streptococcus sobrinus*“ (= d) (Coykendall 1977); Entdeckung einer weiteren Streptokokkenart „*Streptococcus macacae*“ (Loesche 1986); Neubenennung des Serotypen h in „*Streptococcus downei*“ (Whiley et al. 1988); Klassifizierung anhand von Biotypen in fünf Gruppen I, II, III, IV und V (Shklair & Keene 1974). Alle diese kariogenen Mutans-Spezies wurden unter dem Begriff „Mutans Streptokokken“ zusammengefasst (Coykendall 1984). Beim Menschen wird von ca. 300 im Mund befindlichen Bakterienspezies *S. mutans* am häufigsten (70-100%; *Streptococcus sobrinus* <30%) angetroffen, wobei er nachweislich mit Karies korreliert (Loesche 1982, Carlsson et al. 1985, Kristoffersson et al. 1985, Kristoffersson et al. 1986, Loesche 1986, Beighton et al. 1989, Buischi et al. 1989, Hellden et al. 1989, Salonen et al. 1989, Eisenberg et al. 1991).

3.2.2 Ätiologie der Parodontitis

Die Parodontitis ist je nach Ausprägungsart eine mehr oder weniger generalisierte entzündliche multifaktorielle Erkrankung des Parodontiums (Rateitschak et al. 2004). Bakterielle Anlagerungen an der Mundschleimhaut und am Zahn in Form von Plaque initiieren marginale Entzündungsreaktionen. Diese Gingivitiden können bei einem reduzierten Immunstatus, der Präsenz von Risikofaktoren, inflammatorischen Mediatoren und einem Überhandnehmenden parodontogener Bakterien auf die tieferen Strukturen des Zahnhalteapparats übergreifen und eine Auflösung desmodontaler Fasern sowie des Knochens nach sich ziehen (Rateitschak et al. 2004). Es ergibt sich folglich eine Taschenbildung im ursprünglichen Bereich des Zahnhalteapparats. Einsetzender Knochenabbau bedingt im fortgeschrittenen Stadium eine Zahnlockerung und nachfolgenden Zahnverlust (Schroeder 1996). Anhand des Alters zur Zeit des Krankheitsbeginns, des Schweregrades und der endogenen bzw. exogenen Implizität teilt die heutige Medizin die Parodontitis in verschiedene Formen ein (Lautenbach 1992, Lang 2003). Ätiologisch liegen jeder differenzierten Erscheinungsform - analog zur Karies - die vier essentiellen Faktoren zu Grunde, die ausschließlich in Ergänzung das Krankheitsbild ergeben: „Wirt“, „Mikroorganismen“, „Substrat“ und „Zeit“ (König 2000). LOE gelang es mit seinen Mitarbeitern bereits 1965 den essentiellen Zusammenhang zwischen entzündlichen parodontalen Erkrankungen und bakteriellen Einflüssen herzustellen (Loe 1965). Quantitativ unterschiedlich verteilte Bakterienspezies bei parodontal Erkrankten ließen verschiedene Formen mit eigener Ätiologie und Wirtsabwehr vermuten (Haffajee 1988).

Jedoch ist es im Gegensatz zur Karies bei der Parodontitis bis heute nicht möglich, einen speziellen Keim als bakteriellen Auslöser zu isolieren. Vielmehr rufen bei den unterschiedlichen Formen von Parodontitiden eine Reihe von gramnegativen Leitkeimen in Kombination das Krankheitsbild hervor. Dazu gehören vor allem *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Tannerella denticula* und Spirochäten (Dahle et al. 1993, Wolff 1994, Lang 2003, Rateitschak et al. 2004). Die 'American Academy of Periodontology' (= AAP) hat in Zusammenarbeit mit der 'European Federation of Periodontology' (= EFP) eine neue Einteilung der verschiedenen Parodontopathien herausgegeben (Armitage 1999). So unterscheiden sich die dort aufgeführten Chronische Parodontitis (= CP) von der Aggressiven Parodontitis (= AP) nicht nur auf Grund ihres klinischen Erscheinungsbildes, sondern auch signifikant durch ihre differierende subgingivale Flora (Moore & Moore 1994). Für die Lokale Aggressive Parodontitis (= LAP) ist mittlerweile ein sogenanntes Schlüsselbakterium in Form von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (= A.a.) definiert worden (Zambo et al. 1983; van Winkelhoff et al. 1994).

Tabelle 1: Leitkeime einiger Parodontopathien (Taichman 1982, Asikainen 1986, Wolff 1994, Mullally et al. 2000, Rateitschak et al. 2004)

Parodontopathien	Leitkeime neben der Mischflora
Chronische Parodontitis (= CP, Typ II, chronisch langsam verlaufende PA beim Erwachsenen; ehemals 'Adult Periodontitis' (= AP))	in aktiven Taschen häufig gramnegative Spezies: <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> ; grampositive Kokken und Stäbchen
Aggressive Parodontitis (= AP, Typ III, schnell verlaufende PA; ehemals 'Early Onset Periodontitis' (= EOP) und 'Rapid Progressiv Periodontitis' (= RPP))	gramnegative Anaerobier: <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (Invasion?), <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> , <i>Tannerella denticula</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , Spirochäten; einige grampositive Spezies

Nicht nur zwischen den Formen der Parodontitiden, sondern auch innerhalb eines Mundraumes dominieren milieuabhängig unterschiedliche Mikroorganismen. Im Vergleich zur offenen Mundhöhle sind im Sulcus gingivalis vermehrt Anaerobier und gramnegative Erreger lokalisiert (Dzink 1985). In aktiven Parodontaltaschen besteht die subgingivale Plaque zu einem höheren Anteil aus Leitkeimen der Parodontopathien (Wolff 1994) als in weniger aktiven (Lang 2003). Dort treten zum Beispiel *Streptococcus sanguis* (= *S.sanguis*), *Streptococcus mitis* (= *S.mitis*) und *Actinomyces*-Spezies vermehrt in Erscheinung, so dass ihnen eine protektive Wirkung zugeschrieben wird (Dzink 1988). Mit verschiedensten Analysemethoden werden Untergruppen oder variierende Genotypen der mikrobiellen Plaquespezies identifiziert, wodurch sich entsprechend deren Pathogenität und Wirkung verändert (Neiders 1989).

Die meisten Parodontopathien verlaufen in Schüben, welche sich aus der Interaktion zwischen Mikroflora und Wirtsabwehr ergeben. Auf die Anlagerung der Bakterien an die Schleimhautoberfläche und die Invasion reagiert das lokale Gewebe mit immunologischen Abwehrreaktionen, wobei bei Parodontitiden B-Lymphozyten, hingegen bei Gingivitiden T-Lymphozyten dominieren (Manhart 1994). Eine Reduktion der Mikroflora sowie eine nachteilige Schädigung des infiltrierten Gewebes ist die Folge (Socransky et al. 1988).

3.2.3 Plaque

Die Bildung der Plaque als Initiator von Karies oder auch Parodontitis vollzieht sich in vier Phasen, welche nachfolgend erläutert werden (Renggli et al. 1984, Theilade 1989, Schluger et al. 1990).

Als Vermittler der Plaqueentwicklung (= 1.Phase) dient ein dünner, zellfreier, organischer, sich auf alle Zahnflächen wie auch auf künstliche Materialien auflagernder Film: 'acquired pellicle' oder 'Pellicle' (Meckel 1965). Die Art der Bakterien, welche an das 'Pellicle' adhären, wechselt im Verlauf des Plaquewachstums. Studien haben gezeigt, dass zunächst, ca. zwei bis vier Stunden nach der Zahnreinigung, grampositive Mikroorganismen zur Anhaftung an das 'Pellicle' gelangen (= 2.Phase). Zwischen dem dritten bis siebten Tag hingegen dominieren gramnegative in der Plaqueflora (= 3.Phase) (Gibbons & van Houte 1975, Socransky et al. 1977, Theilade et al. 1982). Circa ab der zweiten Woche zeigt die Plaque dann eine komplexe Struktur (= 4.Phase). Die Bakterien in der Plaque funktionieren als eine koordinierte, räumlich organisierte und metabolisch abgestimmte mikrobielle Gemeinschaft (Marsh 2004).

3.2.3.1 'Pellicle'

Die Oberfläche der Zähne ist im wässrigen Milieu überwiegend negativ geladen. Kommt nun eine gereinigte Zahnoberfläche mit Speichel in Kontakt, erfolgt binnen kürzester Zeit eine Anlagerung von Ionen. Diese als 'hydration layer' oder 'Stern-layer' bezeichnete Schicht wurde von ARENDS et al. 1977 in ihrer Zusammensetzung bestimmt: sie enthält zu ca. 90% Calciumionen und zu ca. 10% Phosphationen (Arends et al. 1977). Über die positiv geladenen Ca^{2+} -Ionen lagern sich eine Reihe organischer Komponenten aus dem Speichel, überwiegend Glykoproteine (Mayhall 1970, Sönju et al. 1974, Sönju & Glantz 1975, Li et al. 2004), an. Somit erfolgt die 'Pellicle'-Bildung (Bernardi & Kawasaki 1968, Bennick et al. 1981). In die Reifung des 'Pellicle' greifen noch andere Bindungsmechanismen wie kovalente Bindungen, Ionenbindungen, Ion-Dipol-Interaktionen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, van der Waal's Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit ein (Pruit 1977). Es sind auch neben Speichelbestandteilen, Anteile des Sulkusfluids oder Stoffe bakterieller Herkunft zu finden (Rölla et al. 1982). Im einzelnen besteht das 'Pellicle' aus Proteinen (Albumin, Lysozym), Lipiden (Slomiany et al. 1986), Glykoproteinen (Laktoferrin, IgA, Amylase und Speichelmuzinen) (Levine et al. 1985) und Enzymen (Laktoperoxidase, Lysozym und Glykosyltransferase), die auch nach der Anhaftung noch Aktivität zeigen (Örstavik & Krauss 1974, Pruitt & Adamson 1977, Scheie et al. 1987). Hinzu kommen Proteinfragmente, die aus proteolytischer Aktivität des Speichels resultieren (Jensen et al. 1992). Zur Ermittlung kleinster Bestandteile des 'Pellicle' bedient man sich heute immunologischer Antworten bei Kontakt mit dem Serum (Li et al. 2004). Über die Dicke des 'Pellicle' variieren die Angaben von wenigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern

(Sönju et al. 1974, Hannig 1994). Das Aufgabengebiet des 'Pellicle' ist vielseitig. So bewirken die enthaltenen Muzine und Lipide aus dem Speichel z.B. eine Herabsetzung der Demineralisation der Zahnhartsubstanz, in dem sie als selektive Ionenbarriere fungieren (Slomiany et al. 1986, van Nieuw Amerongen et al. 1987). Das 'Pellicle' stellt in seiner Gesamtheit eine Art Gleitfilm dar, so dass die Zähne bei Artikulationsbewegungen, Kaubewegungen etc. in einem gewissen Maß aneinander vorbeigleiten können (Nikiforuk 1985). Andererseits bildet es die Basis für die selektive Anlagerung einer Reihe von Mikroorganismen, die die Plaquebildung bewirken (Liljemark & Schauer 1975, Clark et al. 1978, Appelbaum et al. 1979, Gibbons & Qureshi 1979, Gibbons & Etherden 1983, Levine et al. 1985, Liljemark et al. 1986, Gibbons & Hay 1989, Gibbons et al. 1991, Olsson et al. 1991, Steinberg et al. 1993). Zum Beispiel erleichtern speziell Muzine die Adhärenz der Bakterien (Pruitt 1977).

3.2.3.2 Plaquebildung

Zu etwa 90% werden die ersten Kolonien von Streptokokken, insbesondere von *S.mitis*, *S.sanguis*, *S.salivarius* und etwas später *S.mutans*, sowie einigen Stäbchen, meist *Actinomyces*-Spezies, gebildet (Theilade et al. 1982). Greift der Mensch nicht in Form von Zahnpflege in das orale System ein, so verschiebt sich bereits innerhalb der ersten zwei Tage das bakterielle Verhältnis hin zu einem größeren Anteil gramnegativer Kokken; im wesentlichen *Veillonella parvula* und *Veillonella alcalescens*. Vermehrt treten auch grampositive und gramnegative Stäbchen auf. Die Menge grampositiver Kokken macht nur noch 50% der Mikroflora aus (Theilade et al. 1982). Langsam beginnen die Bakterien eine Matrix aus extrazellulären Polysacchariden (= EPS) aufzubauen, welche aus Glukanen und Fruktanen bestehen. Sie werden durch bakterielle Fruktosyl- und Glukosyltransferase aus Saccharose synthetisiert. Im Fall der Fruktane bilden sie ein Reservesubstrat, im Fall der Glukane mit einer α -1,3-glykosidischen Verknüpfung eine unlösliche Matrix (König 2000). Natürlich ergeben sich aus dem Abbau niedermolekularer Kohlenhydrate auch große Mengen organischer Säuren, wie vor allem Laktat, welche das azide Milieu verursachen. Auf dem 'Pellicle' haften des Weiteren polymorphkernige Leukozyten und desquamierte Epithelzellen. Diese Epithelzellen transportieren auf ihrer Oberfläche gleichzeitig adhärente Mikroorganismen zur Zahnoberfläche (Theilade et al. 1982). Der weitere Plaqueaufbau erfolgt in mehreren Stadien. Am dritten und vierten Tag dominieren die Fusobakterien und Filamente (Listgarten 1976). Vom fünften bis neunten Tag lagern sich Spirillen und Spirochäten mit ein. In der etablierten Plaque erkennt man deutlich mit Hilfe eines Elektronenmikroskops eine Schicht polymorpher Mikroorganismen, welche der Zahnoberfläche aufliegen. Auf darüber angeordneten Kokken ist eine Schicht senkrecht zur Zahnoberfläche, meist palisadenartig stehender Stäbchen lokalisiert. Zwischen den einzelnen Mikroorganismen befindet sich die Matrix aus EPS. Sie führt zur Verklebung und

Verfilzung der Bakterien und nimmt einen großen Anteil der Gesamtmasse ein (Nyvad & Fejerskov 1986). Zu diesem Zeitpunkt ist die Plaque nur noch mechanisch, im Rahmen einer Zahnreinigung entfernbar. D.h. die bakterielle Adhärenz ist von einer anfänglich reversiblen, lockeren Bindung in eine irreversible, konsolidierende übergegangen (Gibbons & van Houte 1975).

Unspezifische und spezifische Mechanismen zwischen den Bakterien und der Zahn-, 'Pellicle-' bzw. Plaqueoberfläche bedingen die Bindung der Mikroorganismen an die entsprechende Oberfläche. Unspezifische Mechanismen beruhen auf der zufälligen örtlichen Annäherung der negativ geladenen Bakterien an die negativ geladene Zahnoberfläche und demzufolge deren Abstoßung. Durch kurzfristige unsymmetrische Ladungsverteilungen entstehen anziehende Kräfte - die so genannten van der Waals-Kräfte -, welche ab einem Abstand von 50 nm des Bakteriums zur entsprechenden Oberfläche in Aktion treten. Hinzu kommen bei einer weiteren Annäherung elektrostatische Wechselwirkungen (Quirynen & Bollen 1995), sowie hydrophobe und sterische Wechselwirkungen bei weniger als 2 nm Distanz (Absolom et al. 1983). Das Ausmaß des Abstandes zwischen Mikroorganismus und Oberfläche hängt vom pH-Wert und der Kationenkonzentration ab. Sinkt der pH-Wert oder steigt die Konzentration der Kationen vermindert sich entsprechend der Abstand. Trotz allem reichen diese unspezifischen Wechselwirkungen nicht aus, eine dauerhafte Anhaftung zu bewirken (Doyle et al. 1982, Staat & Peyton 1984, Gibbons et al. 1985, Busscher & Weerkamp 1987, Gibbons 1989). Die Bakterien selbst gewährleisten mit ihrer äußersten Schicht, der Glykokalyx, und arteigenen oberflächlichen, aus Proteinen bestehenden Fortsätzen, den Fimbrien, letztendlich die Adhäsion (Buddecke 1981, Carlsson 1989). Stärker anziehende Kräfte kommen zwischen der Zahnoberfläche und den Fimbrien zur Ausbildung: Wasserstoffbrückenbindungen, Ionen-Dipol-Bindungen und polarisierte Atombindungen. Darüber hinaus sind Proteinstrukturen, sogenannte Adhäsine, auf den Fimbrien lokalisiert (Ellen 1985, Ofek et al. 1985), welche über hochspezifische Mechanismen an spezifische auf der Zahnoberfläche vorzufindende Rezeptoren binden (Gibbons 1980, Gibbons et al. 1986). Im Fall des *S. mutans*, wie auch bei einigen anderen Plaque-Bakterien, gelang die Lokalisation und Bestimmung dieser Adhäsine (Kelly et al. 1990, Abeygunawardana et al. 1991). Ein fibrilläres Protein Agl/II mit 185 kDA Molekulargewicht, welches auch als Protein SAI/II (englischer Sprachgebrauch), B (Russel 1979), P1 (Forester et al. 1983), Pac (Okahashi et al. 1989), MSL-1 (Demuth et al. 1990a) oder SR (Ackermans et al. 1985) tituliert wird, bedingt die Bindung von *S. mutans* an die Zahnoberfläche mit (Younson & Kelly 2004). Agl/II bindet an spezifische Speichelproteinrezeptoren, die im 'Pellicle' oder oberflächlich auf adhärennten Mikroorganismen fixiert sind (Hajishengallis & Michalek 1999). So zeigte KOGA zum einen, dass Agl/II-defekte Mutanten von *S. mutans* nur noch in geringem Ausmaße in der Lage sind, an ein experimentell erzeugtes 'Pellicle' zu adhären (Koga et al. 1990), und zum anderen, dass sich eine *S. mutans*-Adhäsion durch freies Agl/II kompetitiv hemmen lässt.

Allgemein gelingt mit Hilfe dieser Adhäsine eine Überbrückung des durchschnittlichen

Abstandes von ca. 10 nm zwischen Zahn und Mikroorganismus in der Phase der reversiblen Anlagerung (Gibbons 1984, van Loosdrecht 1989) und der Übergang zur irreversiblen Adhäsion. Mehrfach durchgeführte Versuche belegten die Aktion dieser speziellen Bindungsmechanismen, da eine kompetitive Blockierung der bakteriellen Adhäsion möglich ist (Clark et al. 1978, Applebaum et al. 1979, Gibbons & Hay 1989, Kishimoto et al. 1991, Hajishengallis et al. 1994). Weitere Studien hoben noch einmal die Spezifität und Selektivität dieser Adhärenzmechanismen hervor. So ergab sich, dass *S.salivarius* mit ca. 45% aller Streptokokken im Speichel dominiert, hingegen er nur 3,4% der Streptokokken auf der Zahnoberfläche bildet. *S.sanguis* stellt im Gegensatz einen Anteil von 16,5% im Speichel und 55,6% auf der Zahnoberfläche (van Houte et al. 1970). Außerdem ist aufgefallen, dass verschiedene Bestandteile des Speichels, wie prolinreiche Proteine (= PRP) (Bennick 1987, Gibbons & Hay 1989), 'saliva-agglutinin' (= SAG) (Lee et al. 1989) und Proteine aus der Muzin-Fraktion submandibulären-sublingualen Speichels (Kishimoto et al. 1989), die Vermittlung der Bindung zwischen den Adhäsinen und den Rezeptoren übernehmen. Allerdings adhären einige Bakterien an z.B. PRPs nur, wenn eine Konformationsänderung derer durch eine Adsorption ihrerseits an Hydroxylapatit stattgefunden hat (Gibbons 1989). Neben der Bindung über Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Ellen 1985, Gibbons 1989) kann es über Lektinbindungen an Glykanstrukturen adsorbierter Speichelbestandteile zur Adhäsion von Mikroorganismen kommen (Kondo et al. 1976, Gibbons & Qureshi 1979, Mirth et al. 1979, Mirth et al. 1981). Auch die Bindung von z.B. *S.mutans* an *Actinobacillus* (= *A.*) *viscosus* und *S.sanguis*, die mit als erste die Zahnoberfläche besiedeln, gestaltet sich mit Hilfe von Speichelglykoproteinen (Lamont & Rosan 1990, Lamont et al. 1991). Diese interbakterielle Bindung wurde in jüngster Zeit intensiv untersucht. WEISS et al. konnten zeigen, dass ein 'high-molecular-weight nondialysable material' (= NDM), welches aus Preisselbeersaft sowie auch aus Heidelbeersaft gewonnen wurde, die interbakterielle Koaggregation reduzieren kann, und es somit gelingt, den *S.mutans*-Anteil im Speichel zu reduzieren (Weiss et al. 2002 + 2004). Des Weiteren beeinflusst NDM über die Inhibition von Glykosyl- und Fructosyltransferasen die Bakterien bei dem Aufbau der Matix aus extrazellulären Polysacchariden und somit die Plaquebildung (Steinberg et al. 2004).

3.3 Bakterielle Bindungsmechanismen

Für entzündungsinduzierende Mikroorganismen bestehen unterschiedliche Möglichkeiten der Adhäsion. Die allgemeine Adhäsionsfähigkeit eines Bakteriums deutet auf einen wichtigen Virulenzfaktor in Bezug auf Karies und Parodontitis hin (Gibbons et al. 1975, Ofek et al. 2003). So ist die Adhäsion eine der initialen Stufen des infektiösen Prozesses (Ofek et al. 2003). Mit der Annahme, dass das Adhäsin mehrere Bindungsdomänen besitzt, kommen wahrscheinlich gleichzeitig verschiedene Bindungsarten zum Einsatz. Neben der beispielsweise möglichen

Adhäsion-Rezeptor-Bindung mittels Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Ellen 1985, Gibbons 1989) können Bakterien über Lektine, spezielle Adhäsionsproteine, an Glykanstrukturen adhären (Kondo et al. 1976, Gibbons & Qureshi 1979, Mirth et al. 1979, Mirth et al. 1981, Ofek 1990). Auch die interbakterielle Bindung von z.B. *S. mutans* an *A. viscosus* und *S. sanguis*, die mit als erste die Zahnoberfläche oder Mundschleimhautareale besiedeln, gestaltet sich mit Hilfe von adsorbierten Speichelglykoproteinen (Lamont & Rosan 1990, Lamont et al. 1991).

3.3.1 Lektine

Definitionsgemäß sind Lektine kohlenhydratbindende Proteine oder Glykoproteine nicht-immunologischer Herkunft. Sie besitzen mindestens zwei Bindungsstellen und können die Zellen agglutinieren und/oder Glykokonjugate präzipitieren (Kocourek & Herejisi 1981, Nomenclature Committee of IUB 1981). Die Bezeichnung wurde 1954 von BOYD und SHAPLEIGH geprägt (Uhlenbruck 1984). Als Bestandteil von Fimbrien und Pili befinden sich Lektine häufig auf Bakterienoberflächen (Ellen & Sivendra 1985, Sharon 1987). Viele von ihnen wirken als Mitogen. Sie treten bei Viren, Bakteriophagen, anderen Mikroorganismen, Pflanzen, Avertebraten sowie Vertebraten auf und liegen als Membranbestandteile oder auch in gelöster Form vor (Lis & Sharon 1986, Chrispeels & Raikhel 1991, Kishore et al. 1997). Beim Menschen sind Lektine z.B. als Zellbestandteil auf Hepatocyten lokalisiert, wo sie teilweise desialylierte Erythrozyten erkennen und diese aus dem zirkulierenden Blut entfernen (Ashwell 1974). In den letzten zwei Jahrzehnten sind mehr als 100 Lektine in ihren Strukturen nachgewiesen worden (Sharon & Lis 2004). In biowissenschaftlichen Untersuchungen werden sie zur Affinitätschromatographie, Charakterisierung und Separation von Zellen, in der Histologie oder bei der Ermittlung der Aktivierbarkeit von immunkompetenten Zellen eingesetzt (Judd 1980; Raedler & Raedler 1985, Franz 1992, Sharon & Lis 2004). Den Bakterien dienen sie in Form von Oberflächenglykoproteinen zur Adhäsion an Schleimhautoberflächen und werden daher häufig als Adhäsine oder Agglutinine bezeichnet (Ofek & Sharon 1990). Auf Grund der sich ergebenden Induktion von Infektionen gewinnen Lektine immer mehr als Pathogenitätsmarker an Bedeutung (Franz 1992). Sie binden mit hoher Affinität an Zucker, reine Oligosaccharide, auch Glykane genannt, sowie an die in Glykoproteinen, Polysacchariden oder Glykolipiden integrierten Oligosaccharide (Uhlenbruck et al. 1983). Die Spezifität der Lektine ergibt sich aus ihrer chemischen Struktur (Sharon & Lis 2004). Nach erfolgter Bindung zeigen Lektine gegenüber den Kohlenhydraten keine enzymatische Aktivität (Kocourek & Herejisi 1981). Die Spezifität der unterschiedlichen Bakterien zu Glykanstrukturen kann erheblich voneinander abweichen. Sogar Subspezies besitzen im internen Vergleich starke Differenzen in Bezug auf ihre Rezeptorspezifität, wie es durch eine Studie mit *Escherichia coli* bewiesen wurde (Lund et al. 1988). Dies ist unter anderem durch die hohe Variabilität der Glykanstrukturen zu erklären.

3.3.1.1 Lektinbindungen

Die bakterielle Anhaftung an Zahnoberflächen kann über Lektine erfolgen, welche mit Glykanstrukturen adsorbierter Speichelproteine eine Bindung eingehen (Kondo et al. 1976, Gibbons & Quershi 1979, Mirth et al. 1979, Mirth et al. 1981). Eine große Anzahl verschiedenster Kohlenhydratmoleküle, wie Glukosamine, Galaktose, Mannose, N-Acetyl-Galaktosamin und Sialinsäure, dienen als Bausteine der Lektinrezeptoren. Ihre Art der glykosidischen Verknüpfung bedingt eine zusätzliche Bedeutung und Veränderlichkeit. Zum Beispiel bindet 'VVA' (= *Vicia villosa* Agglutinin) als Lektin der Zottigen Wicke (= *Vicia villosa*) spezifisch an N-Acetyl-Galaktosamin, welches mit Serin und Threonin verknüpft ist (Wu 1988). Die Abbildung 2 verdeutlicht eine mögliche Kolonisation einer dentalen Oberfläche durch *S. mutans*.

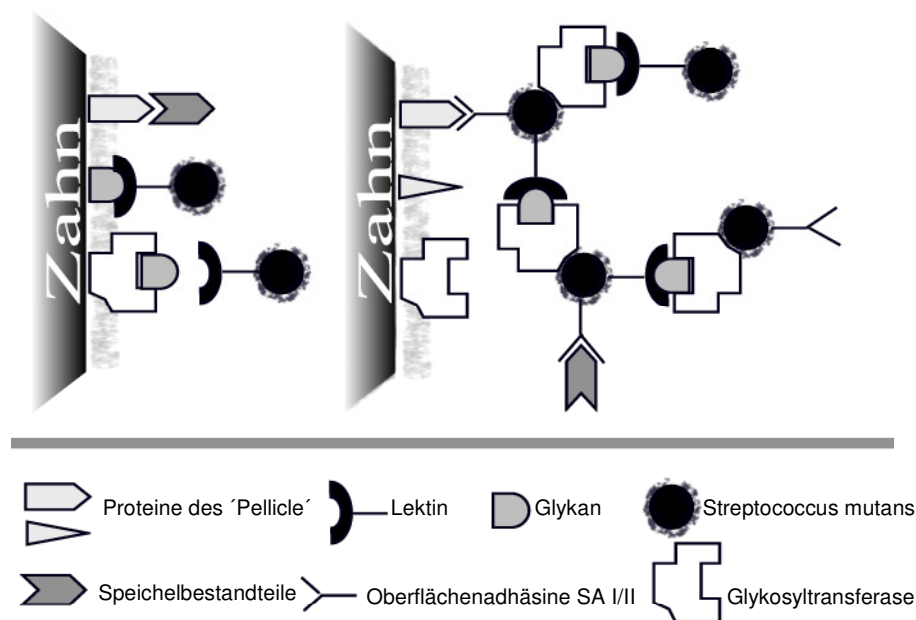


Abbildung 2: links: Adhäsion von Glykanen direkt oder über eine Glykosyltransferase-Kopplung an die Zahnoberfläche ⇒ *S. mutans* bindet spezifisch über Glykan-bindende Proteine, die so genannten Lektine;
rechts: direkte, initiale Adhäsion von *S. mutans* an 'Pellicle'-Proteine aufgrund von Oberflächenadhäsinen, z.B. SA I/II = AgI/II, ⇒ Akkumulation von *S. mutans* durch Speichelkomponenten oder wie hier beispielsweise angezeigt durch Lektine, Glykane und Glykosyltransferasen; ⇒ die Entstehung eines pathogenen Biofilms nimmt ihren Lauf (umgezeichneter Ausschnitt aus Hajishengallis & Michalek 1999).

In Bezug auf Lektinbindungen, die Bedeutung im Mundraum haben, wurden bereits einige Untersuchungen durchgeführt. So ergab sich z.B. bei GIBBONS & QURESHI, dass die Adhärenz von *S. mutans* (Serotypen a, b, c, e, g) an S-HA (= 'saliva coated hydroxyapatit') durch 0,1 M Galaktose und Melibiose (6 α -D-Galaktosyl-D-Glukose), nicht jedoch durch Laktose gehemmt wird. Somit ist der Beweis für die Existenz eines *S. mutans*-Lektins erbracht, welches mit Spezifität für α -Galaktoside an Speichelproteine des 'Pellicle' bindet (Gibbons & Qureshi 1979). LEVINE belegte Ähnliches: Muzine sind nach einer Vorbehandlung mit α -Galaktosidase in ihrer Fähigkeit, zur Agglutination von *S. mutans* beizutragen, gehemmt (Levine et al. 1978). Damit lassen sich auch Beobachtungen von FAN vereinbaren, der eine signifikant verminderte Bindung von *S. mutans* an S-HA durch enzymatische Abspaltung von Sialinsäure aus dem künstlichen 'Pellicle' feststellte. Er schließt daraus auf eine Existenz eines für Sialinsäure spezifischen Adhäsivs auf der Zelloberfläche von *S. mutans* (Fan 1993). LIGTENBERG konnte zeigen, dass durch Speichel von Probanden der Blutgruppe B eine Agglutination von *S. mutans* herbeigeführt werden konnte, nicht jedoch durch den der Blutgruppe A (Ligtenberg et al. 1990b). Die Blutgruppenantigene des ABO-Systems, die auch im Speichel enthalten sind, bilden wohl die bekanntesten Lektin-inhibitorischen Glykanstrukturen (Prakobphol et al. 1993).

Mehrere Autoren beschäftigten sich mit dem Nachweis für ein Oberflächenprotein des *S. sanguis* als früher Kolonialisierer im Rahmen der Plaquebildung. Dieses bindet an Neuraminsäurereste der Kohlenhydratseitenketten von Speichelmuzinen (McBride & Gisslow 1977, Murray et al. 1982, Stinson et al. 1982, Murray et al. 1984, Demuth et al. 1990b, Neeser et al. 1995). Nachdem mit Hilfe einer Neuraminidase Sialinsäure aus den Muzinen entfernt worden war, ergab sich bei Untersuchungen mit *S. mutans* und *S. sanguis* ein Aggregationsverlust für *S. sanguis*, nicht jedoch für *S. mutans* (Levine et al. 1978). Damit in Einklang steht auch das Ergebnis von GIBBONS & ETHERDEN, welche durch Vorbehandlung des 'Pellicle' mit Neuraminidase die Adhäsion von *S. sanguis* reduzieren konnten (Gibbons & Etherden 1982). Aufschluss über die Anlagerung von *S. mutans* an bereits in der Plaque integrierte Erstbesiedler-Bakterien, worunter z.B. *Actinomyces viscosus* und *S. sanguis* zu verstehen sind, gaben Untersuchungen von LAMONT. Demzufolge vermitteln Speichelglykoproteine, wie das 400 kDA schwere 'saliva-agglutinin', die Adhäsion von Mutans-Streptokokken an diese Erstbesiedler-Bakterien (Lamont & Rosan 1990, Lamont et al. 1991).

3.4 Abwehrmechanismen der Mundhöhle

Der menschliche Organismus ist eigenständig in der Lage, sich bis zu einem gewissen Grad gegen eindringende oder in erhöhter Menge auftretende Mikroorganismen zu schützen. Bei der Verminderung bzw. Vermeidung von kariösen Läsionen und parodontalen Entzündungen spielt neben dem Sulkusfluid und der Abschilferung von Schleimhautepithelien die reflektorische

Variabilität der Produktion von Speichel in den Speicheldrüsen eine zentrale Rolle. Den Drüsen ist es bei Stimulation einzelner Nervenfasern möglich, sowohl die Speichelmenge als auch die Speichelzusammensetzung zu verändern (Garrett et al. 1991).

3.4.1 Sulkusfluid

Subepitheliale Gefäße sondern ein osmotisch bedingtes Transsudat in den dentalen Sulkus ab. Dieses Sulkusfluid verändert sich bei Entzündungen und Ausbildung von gingivalen bzw. parodontalen Taschen in seiner Zusammensetzung sowie in seiner Sekretionsgeschwindigkeit und dient der Schutz- und Abwehrreaktion des Körpers (König 2000). Neben dem Serum und den entsprechenden Mikroorganismen mit ihren Stoffwechselprodukten enthält es zelluläre Bestandteile, wie Makrophagen, Lymphozyten und mit über 90% Zellanteil dominierende Granulozyten (Cimasoni & Giannopoulos 1988). Hinzu kommen nicht-zelluläre Anteile. So sind auch Glykoproteine als Enzyme neben den spezifischen Antikörper IgG, IgM, IgA (Roitt et al. 1985), Cytokinen und Elektrolyten im Sulkusfluid zu finden.

3.4.2 Speicheldrüsen

Der die Mundschleimhaut umspülende Speichel stammt aus den verschiedenen exokrinen Drüsen, welche embryologisch alle ektodermaler Herkunft sind. Neben den kleinen Speicheldrüsen, Glandulae labiales, buccales, palatinae und linguales, münden auch die Ausführungsgänge der paarig angeordneten großen Drüsen, Glandula parotidea, submandibularis und sublingualis, in den Mundraum (Silbernagel & Dispopoulos 2003). Vom Aufbau ähneln sich die großen Speicheldrüsen. Sie sind unterteilt in ein bindegewebig eingebettetes und von einer Basalmembran umgebenes sezernierendes Endstück, den Azinus, sowie ein verzweigtes Ausführungsgangsystem, die Tubuli. Die strukturelle Untereinheit bilden die Drüsenläppchen, welche sich aus pyramidalen Drüsenzellen zusammensetzen (Ten Cate 1989). Ihre sekretorischen Granula werden aufgrund der differenzierten histochemischen Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin als serös bzw. mukös bezeichnet. Sie erscheinen elektronenmikroskopisch zum einen elektronendicht, zum anderen blass und strukturlos (Phillips et al. 1993) und bewirken eine geringe oder hohe Viskosität des Speichels. Der in den Drüsenzellen produzierte Mukus gelangt aus dem Lumen der Drüsenendstücke über Schaltstücke in intralobuläre Sekretrohre oder Streifenstücke. Von dort wird er weiter in interlobuläre Ausführungsgänge transportiert. Drüsenendstücke und Schaltstücke sind von einem myoepithelialen kontraktilem Netzwerk umgeben, so dass es zu einer aktiven Exkretion des Mukus kommen kann (Seifert et al. 1984, Pinkstaff 1993).

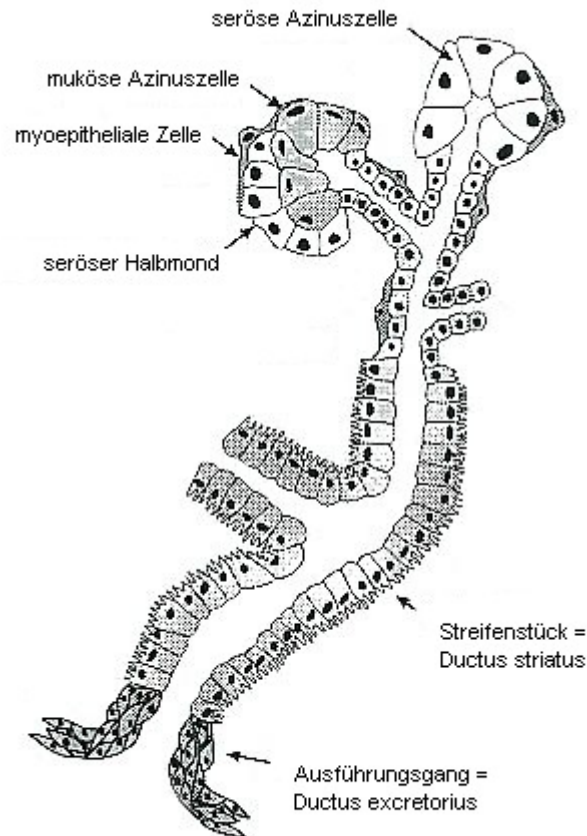


Abbildung 3: Übersicht der histologischen Struktur einer Speicheldrüse - umgezeichnet nach WM Edgar & DM O'Mullane, 1996, 'Saliva and Oral Health' -

Die Innervation der Speicheldrüsen erfolgt autonom. Die parasympathischen Fasern stammen für die Glandula parotidea aus dem Nucleus salivatorius inferior und ziehen mit dem Nervus glossopharyngeus über das Ganglion petrosum, den Nervus tympanicus, den Nervus petrosus minor zum Ganglion oticum; für die Glandulae submandibulares und sublinguales aus dem Nucleus salivatorius superior und schließen sich der Chorda tympani sowie dem Nervus lingualis zum Ganglion submandibulare an. Sympathisch wird die Glandula parotidea aus dem Ganglion cervicale superior, die Glandulae submandibulares und sublinguales aus dem Plexus der Arteria facialis bzw. lingualis versorgt (Eneroth et al. 1969, Silbernagel & Dispopoulos 2003). Die Sekretion wird hauptsächlich durch parasympathische Impulse kontrolliert, wobei auch sympathische Fasern in der Lage sind, den Speichelfluss zu erhöhen. Über freigesetzte Neurotransmitter, wie Noradrenalin, Acetylcholin, aber auch Neuropeptide, wie VIP (= 'vasoactive intestinal peptide'), NPY (= 'neuropeptide tyrosine'), CGRP (= 'calcitonin gene related peptide') und SP (= 'substance P') des parasympathischen und sympathischen Nervensystems erfolgt mittels einer Bindung an Drüsenzellrezeptoren die Aktivierung der Protein- und Flüssigkeitssekretion in die Speicheldrüsengänge

(Hauser et al. 1992). Diese Rezeptoren sind spezifisch für Acetylcholin, die einzelnen Neuropeptide und Noradrenalin, wobei an Drüsenzellen der Glandula parotidea sowohl α -adrenerge als auch β -adrenerge Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Speichelskonsistenz und Sekretionsgeschwindigkeit sind somit durch die Reizung einzelner Nervenfasern beeinflussbar (Garrett & Anderson 1991). Die Zusammensetzung des Speichels unterliegt der Kontrolle der sympathischen Impulse, indem diese eine Zunahme der Exozytose an bestimmten Zellen des Drüsenapparates bewirken (Whelton 1996). Eine reflektorische Speichelsekretion ergibt sich bei Berührung der Zunge, bei Erregung der Geschmacksfasern, durch Riechstoffe und durch zentrale Regulationen auf Grund psychogener Einflüsse (Schiebler et al. 1997).

3.4.3 Speichel

Für die Limitierung der mikroorganischen Besiedlung der Mundhöhle ist ein komplexer Schutz notwendig. Neben äußeren Einflüssen wie Nahrungsaufnahme, Zahnpflege und habitueller Mundatmung beeinflusst der Speichel als endogener Aspekt orale Bakterienpopulationen ganz entscheidend. Er deckt einen vielschichtigen Aufgabenbereich ab (Malamud et al. 1993) und ist essentiell für den lebenslangen Schutz der Zähne (van Nieuw Amerongen et al. 2004). Eine frequente Speichelflussmenge eliminiert den größten bakteriellen Anteil beim Schluckvorgang mit den Nahrungsbestandteilen aus der Mundhöhle (Melvin 1991, Kayser et al. 2001). Sie bewirkt außerdem anfänglich das Maß der Adhäsion und der Ablösung der noch recht locker an der Zahnoberfläche haftenden Bakterien (Tenovou et al. 1994). Unter Ruhebedingungen produzieren die Speicheldrüsen insgesamt 0,25 - 0,5 ml/min Speichel (Dawes 1985, Osterberg et al. 1992), wobei anteilmäßig auf die Glandula parotidea ~28%, auf die Glandulae submandibulares /-linguales ~68% und auf die kleinen mukösen Schleimhautdrüsen ~4% entfallen (Sreebny 1996). Unterschiedlichste Faktoren, wie mechanische, gustatorische und olfaktorische Reize, können den Speichelfluss stimulieren. So nehmen auch die bloße Nahrungsaufnahme inklusive Schluckreflex, das Alter und das Geschlecht des Patienten, der Nikotinkonsum, ein gegebener Brechreiz, sowie die Größe der Speicheldrüse einen mehr oder weniger entscheidenden Einfluss (Dawes 1987, Bourdiol et al. 2004). Nach der Stimulation sondern die Drüsen 1 – 3 ml/min bzw. maximal 10 ml/min Speichel ab (Johansson et al. 1986, Ericson & Mäkinen 1986, Birkhed & Heintze 1989, Atkinson et al. 1992). Hingegen ruft die krankhafte Hypofunktion der Speicheldrüsen mit verringerter Speichelflussrate, die z.B. im höheren Alter oder auch nach einer Bestrahlungstherapie auftreten kann (Someya et al. 2003), das klinische Bild einer Xerostomie hervor. 0,1 ml/min Speichel oder weniger belegen nach subjektiver Mundtrockenheit das Erkrankungsbild eindeutig (Narhi 1994). Es ist erwiesen, dass sich Karies und Parodontopathien bei Xerostomie eher und extremer manifestieren (Navazesh et al. 1992). Die orale Besiedelung durch *S. mutans* und *Candida albicans* schreitet rascher voran

(Bowen et al. 1988, Ooshima et al. 1990, Jorge et al. 1993).

Neben der Speichelmenge ist auch die Zusammensetzung des Speichels von entscheidender Bedeutung. So wird zum Beispiel der Abwehrmechanismus zur Vermeidung der Penetration der Pathogene durch die Mundschleimhaut unter anderem durch die Zusammensetzung des Speichelsekrets beeinflusst (Jenkins 1978, Mandel 1987).

Speichel besteht zu 99,3% aus Wasser, zu 0,5% aus organischen Anteilen und zu 0,2% aus anorganischem Calcium, Natrium, Kalium, Phosphat, Chlorid, Karbonat, Thiozyanid und Fluorid (Lautenbach 1992). Knapp die Hälfte der organischen Anteile bildet das Muzin, ein muköses Glykoprotein, welches mit überwiegend O-glykosidischen Bindungen und hohem Molekulargewicht den viskösen Charakter ausmacht. Insgesamt enthält das Drüsensekret 25 bis 35 unterschiedliche Proteine mit 150 – 264 mg/100 ml Speichel. Den Hauptteil stellen prolinreiche Proteine (= PRPs) und Amylase (Azen 1989). Beide gehören mit Peroxidase und Anhydrase zu den N-glykosidisch verknüpften Glykoproteinen niedrigeren Molekulargewichts des serösen Typs.

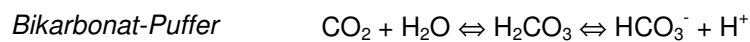
Die Zusammensetzung des Speichels wird durch eine Reihe von Faktoren, unter anderem durch die Aktivität der unterschiedlichen Drüsen, bestimmt. So ist z.B. erwiesen, dass der größte Teil der Amylase in der Glandula parotidea produziert wird, hingegen Blutgruppen-Antigene vermehrt durch die mukösen kleinen Speicheldrüsen in das Sekret freigesetzt werden (Mandel 1989). Zu den Einflussfaktoren sind wie folgt zu zählen (Dawes 1996):

- Art der Speicheldrüse,
- Art und Weise des Stimulus,
- Flussrate,
- Dauer der Stimulation,
- vorangegangene Stimulationen,
- Mund- und Körperbewegungen,
- biologischer Rhythmus,
- Hormone,
- Schwangerschaft,
- Plasma-Zusammensetzung,
- genetischer Polymorphismus,
- Drogen und
- vielfältige Krankheitsbilder.

Funktionell deckt Speichel durch seine komplexen Inhaltsstoffe vielseitige, den Mundraum schützende Aufgabenbereiche ab.

3.4.3.1 Säure-Neutralisation

Frischer Speichel, der leicht acide reagiert, weist einen pH-Wert von ca. 6,7 mit circadianen Schwankungen auf. So sinkt die Säureproduktion während des Essens und steigt danach und vor allem auch des Nachts an (Lautenbach 1992). Auf Grund seiner Glykoprotein-, Bikarbonat- und Phosphatbestandteile reguliert er die Homöostase der Mundhöhle. Die Pufferwirkung ergibt sich vor allem aus den zwei bekannten Systemen mit folgender chemischer Reaktionsgleichung:



Der Ausgleich oraler pH-Wert-Schwankungen ist wichtig, da z.B. bereits bei einem pH-Wert-Abfall auf 5,7 der Zahnschmelz (Graf 1970) bzw. auf 6,0 - 6,8 das Dentin (Hoppenbrouwers et al. 1987) geschädigt werden.

3.4.3.2 Remineralisation

Der bakteriell bedingten Demineralisation des zu ca. 97% aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) bestehenden Zahnschmelzes wirken Calcium- und Phosphationen aus dem Speichel entgegen. Unter Mithilfe der Speichelproteine Cystatin, Histatin, Statherin sowie PRPs ist eine Remineralisation des Zahnschmelzes und die Aufrechterhaltung eines Mineralisationsgleichgewichts in der Mundhöhle möglich (Nieuw et al. 1987, Hay et al. 1989). Diese Proteine halten intrapelliculär das Überangebot von Calcium- und Phosphationen aus dem Speichel in Lösung, was eine Grundvoraussetzung für die Remineralisation darstellt (Schlesinger et al. 1989). Bei einer bakteriell induzierten Proteolyse kommt es hingegen zu einer Präzipitation von Calcium und Phosphat, so dass eine Demineralisation der Zahnhartsubstanz auf diese Weise nicht mehr zu verhindern ist (Hay et al. 1984).

3.4.3.3 Fluoride

Fluoride zählen zu den natürlichen Bestandteilen des menschlichen Stoffwechsels und befinden sich mit ihrem Hauptanteil von 99% im Knochen. Sie sind aber auch als Bestandteil des Zahnschmelzes von entscheidender Bedeutung. Neben den bereits während der Entwicklung in die Zahnhartsubstanz integrierten Fluoridionen diffundieren sie stetig in die Zahnoberfläche. Daraus resultiert eine verstärkte Resistenz der Zähne gegenüber den bakteriellen Angriffen,

welche durch eine bestimmte Fluoridkonzentrationserhöhung optimiert werden kann (Weatherell et al. 1986). Das De- und Remineralisationsgleichgewicht verschiebt sich in Richtung Remineralisation. Des Weiteren zeigt Fluorid als Flusssäure (= HF) antibakterielle Eigenschaften. Es dringt in dieser chemischen Form in Bakterienzellen ein, dissoziiert dort in H^+ und F^- , bewirkt eine Ansäuerung und folglich eine unspezifische Hemmung von bakteriellen Enzymen (Hamilton et al. 1988). Der Speichel weist eine Fluoridkonzentration von 0,01 – 0,05 ppm auf (Geddes et al. 1988). Eine erhöhte Konzentration im Mundraum lässt sich lokal durch Zahnpasten und Mundwasser, sowie systemisch mit einer nachfolgenden Speichelfluoridkonzentrationssteigerung durch fluoridiertes Speisesalz, Fluoridtabletten und Trinkwasserfluoridierung hervorrufen (Marthaler 1988).

3.4.3.4 unspezifische antibakterielle Schutzfaktoren

Einige Glykane wirken nicht spezifisch im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion, sondern weisen als Enzyme eine gewisse unspezifische antibakterielle Wirkung auf.

Unter anderem gehören zu diesem Schutzfaktorenkomplex:

- Lysozym: Dieses kleine Protein hat eine begrenzte bakterizide Wirkung. Es ist in der Lage, die β -1,4-Bindung zwischen N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetylmuraminsäure des Mureins, einem wichtigen bakteriellen Zellwandbestandteil, hydrolytisch zu spalten. Da gramnegative Bakterien diesen Zellwandbestandteil nur in geringer Konzentration aufweisen, zeigt Lysozym bei ihnen keine Wirksamkeit (Iacono et al. 1982).
- Peroxidase: Dieses Glykoprotein oxidiert Thiocyanat (= SCN^-) aus dem Speichel zu Hypothiocyanat (= $OSCN^-$) unter Mitwirkung des dem aeroben bakteriellen Stoffwechsel entstammenden Wasserstoffperoxid (= H_2O_2) (Hoogendoorn et al. 1977, Mansson-Rahemtulla et al. 1988). Hypothiocyanat wiederum behindert den mikroorganischen Metabolismus, indem es Enzyme der Glykolyse und des Kohlenhydrattransportes und folglich die Säureproduktion, sowie die H_2O_2 -Bildung hemmt (Scannapieco & Levine 1990). Auf diese Weise bedingt Peroxidase eine Toxizität von Mikroorganismen, insbesondere von Streptokokken (Thomas et al. 1994).
- Laktoferrin: Dieses Glykoprotein ist in fast allen Sekreten zu finden und wird von Drüsenzellen sowie polymorphkernigen Leukozyten synthetisiert (Buddecke 1981). Ein jedes Ion besitzt die Bindungskapazität für zwei Eisenatome. Es wirkt somit bakteriostatisch (Bullen et al. 1972), da Eisenionen essentiell für das Wachstum einiger Mikroorganismen sind. Die Chelatierung der Eisenionen durch das Laktoferrin wird als 'nutritional immunity' bezeichnet (Hay et al. 1996), wobei der bakteriostatische Effekt durch die Absättigung des Glykoproteins in seiner Wirkung begrenzt ist (Gutteridge et al. 1981). Es besitzt ein hohes therapeutisches Potential, wobei gerade bei Kariesuntersuchungen mit unstimuliertem bzw. stimuliertem Speichel sich weitere Zusammenhänge abzeichnen und weitere Forschung betrieben werden soll (Weinberg 2003, Jentsch et al. 2004a + b).

3.4.3.5 spezifisches sekretorisches Immunsystem

Wie in anderen Körperflüssigkeiten lassen sich auch im Speichel alle Immunglobulinklassen nachweisen. Diese den antigenspezifischen Schutz vermittelnden Antikörpertypen zeigen ein differierendes prozentuales Verhältnis im Vergleich zu Blutserum und Sulkusfluid (Roitt et al. 1983). Das als entzündliches Exsudat aus dem gingivalen Saum austretende Sulkusfluid besteht neben polymorphkernigen und mononukleären Leukozyten - wie auch das Serum - zu einem großen Teil aus IgG (Sugiyama et al. 1992). Das dominierende Immunglobulin im Speichel ist das IgA. IgD und IgE liegen nur in ganz geringer Konzentration vor.

Tabelle 2: Konzentration der Immunglobulinklassen in µg/ml (Roitt & Lehner 1983)

	IgG	IgM	IgA
Serum	12.500	800	2.200
Speichel	14	2	194
Sulkusfluid	3.500	250	1.100

Nach Kontakt der Schleimhäute mit Pathogenen differenzieren sich über einen T-Lymphozyten-abhängigen Prozess IgA-produzierende Plasmazellen (Mestecky 1987). Im Gegensatz zum Serum-IgA, das aus dem Knochenmark und der Milz stammt, wird Speichel-IgA (= s-IgA) in peripheren Lymphknoten und zirkulierenden Lymphozyten der Schleimhäute gebildet. Die beiden Immunglobuline unterscheiden sich auch strukturell: s-IgA existiert nur in dimerer Form und ist zusätzlich mit einer Glykoproteinkette, der so genannten sekretorischen Komponente, versehen (Klein 1991). MESTECKY prägte 1987 den Begriff eines Mukosa-assoziierten Immunsystems (= MALT = 'mucosa associated lymphoid tissue') oder sekretorischen Immunsystems, welches sich aus s-IgA, Lymphozyten und Plasmazellen zusammensetzt (Mestecky 1987). Im Zusammenspiel ist es in der Lage, die Schleimhautoberfläche vor löslichen Antigenen und der Adhäsion von Mikroorganismen zu schützen (Tomasi & Bienenstock 1968). Hohe Konzentrationen bewirken sogar eine Verminderung der viralen Haftung an Zelloberflächen. Über eine Agglutination des Antikörpers mit dem entsprechenden Antigen wird das Pathogen inaktiviert und folglich durch den Speichelfluss eliminiert (Schiff 1986). Zusätzlich erleichtert IgA durch seine Fc-Rezeptoren die Aufnahme des Antigen-Antikörperkomplexes in die Körperzelle, sowie es auch die Neutralisation von mikrobiellen Enzymen und Toxinen unterstützt (Muster 1995). Wichtig für das Ausmaß des Kariesbefalls ist auch, dass s-IgA das Oberflächenantigen AgI/II von *S. mutans* spezifisch binden kann und somit dessen Adhäsion an S-HA verhindert wird (Hajishengallis et al. 1992). Eine Steigerung der sekretorischen

Antikörperproduktion gegen *S.mutans* durch Einwirkung von Antigenen beim Menschen ist ebenfalls erwiesen (Mestecky et al. 1978, Czerkinsky et al. 1987, Childers et al. 2001, Smith et al. 2001). Hingegen gelang es nicht, durch lokale, bewusst initiierte *S.mutans*-, *S.sanguis*- und *Actinomyces viscosus* - Applikationen die sekretorische Antikörperfraktion im Speichel zu erhöhen (Hägewald et al. 2000). Bislang ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem sekretorischen Immunsystem und den bakteriell vielschichtigen Parodontitisformen herstellen (Dahlen et al. 1993, Levine et al. 1996).

3.4.3.6 *Glykokonjugate des Speichels*

Glykokonjugate besitzen stets einen Kohlenhydratanteil, den Glykananteil, der in seiner Dimension von einem Monosaccharid bis hin zu Polysacchariden variieren kann (Stryer et al. 2003). Die Polysaccharide setzen sich meist aus verschiedenen Monosacchariden zusammen, so dass sich ein Heteroglykan ergibt. Die Glykosylierung vollzieht sich entweder an Lipiden oder Proteinen (Horowitz et al. 1978). Im Speichel liegen zum überwiegenden Teil Glykoproteine vor, die entsprechend der Größe des Kohlenhydratanteils dem Sekret seinen serösen oder mukösen Charakter verleihen. Zusätzlich treten im mukösen Sekret der Glandulae submandibulares /-linguales und der meisten kleinen Speicheldrüsen dominierend hohe Anteile an O-Glykanen auf. Sie enthalten charakteristischerweise keine Mannose. Dem gegenüber zeichnet sich das seröse Sekret der Glandula parotidea durch N-Glykane mit hohen Konzentrationen von Mannose, endständigen Fukose- und Sialinsäureresten sowie wenigen oder keinen N-Acetyl-Galaktosaminen aus (Tolson et al. 1985). Wie bereits erwähnt, stellen die Muzine als muköse Glykoproteine und die prolinreichen Proteine als seröse Glykoproteine den Hauptteil der 60 g Speichelglykoproteine, die pro Tag sezerniert werden. Auf Grund der unterschiedlichen Verknüpfungen der Proteinanteile mit den Kohlenhydratanteilen ergeben sich bei den Muzinen zwei Untergruppen: die MG1 = 'high molecular weight mucin glycoprotein' mit O-glykosidischen Bindungen und die MG2 = 'low molecular weight mucin glycoprotein' mit O-glykosidischen und einem geringen Anteil an N-glykosidischen Bindungen. Zusätzliche Unterschiede innerhalb dieser Untergruppen lassen sich durch β -adrenerg induzierte Variationen des Glykananteils initiieren, wodurch z.B. deren Adhärenz an Hydroxylapatit erhöht wird (Baum et al. 1990). Tabelle 3 gibt als Beispiel für die strukturelle Variabilität von Glykoproteinen eine Übersicht über die unterschiedlichen Eigenschaften von MG1, MG2 und PRP wieder.

Tabelle 3: Eigenschaften der mukösen MG1- und MG2-Speichelproteine aus der Glandula submandibularis bzw. sublingualis, sowie der serösen PRP-Speichelglykoproteine aus der Glandula parotidea (Edgar 1992)

	MG1	MG2	PRP
relatives Molekulargewicht (kDA)	< 10 ³	200-500	40
Polypeptidanteil (%)	15	30	60
Kohlenhydratanteil (%)	75	68	30
Art der glykosidischen Bindung	GalNAc-Thr/Ser	GalNAc-Thr/Ser & (GlcNAc-Asn)	GlcNAc-Asn
Anzahl der Oligosaccharid-Ketten	46	170	6
Untereinheit	ja	nein	nein
gebundenes Sulfat	ja	?	nein
gebundenes Phosphat	nein	?	ja
gebundene Sialinsäure	ja	ja	?
Blutgruppenaktivität	ja; „Hauptträger“	ja	nein

3.4.3.6.1 Synthese von Speichelglykoproteinen

Die Synthese der Speichelglykoproteine ist ein sehr komplexer Vorgang, der in seiner Gesamtheit noch nicht erforscht wurde. Viele extraglanduläre (siehe 3.4.3) und zelleigene Faktoren, wie die Spezifität und Aktivität der genetisch determinierten Glykosylierungsenzyme, die Verfügbarkeit von Substraten, d.h. Nukleosiddiphosphat-aktive Monosaccharide und Glykan-Akzeptoren, sowie die Primärstruktur des Proteins, beeinflussen die Produktion und folgende Sekretion der Glykoproteine. So zeigten auch Studien an Parotisgewebe von Ratten, dass eine β -adrenerge Stimulation die Protein- und Glykoproteinsynthese steigert, sowie Enzyme der N-Glykosylierung kontrolliert (Kousvelari et al. 1983 + 1984). Folgende 'in vivo'-Studien bestätigten eine β -adrenerg abhängige Erhöhung der Synthese von 'high-mannose-type'-Glykanen (Kage 2001). Dieser Abschnitt soll ausschließlich einen generellen Überblick über die Glykoproteinentstehung geben.

Es existieren aufgrund der zwei differierenden Bindungsformen zwischen den Protein- und Glykananteilen zwei Synthesewege, die KORNFELD & KORNFELD 1985 sowie HIRSCHBERG & SNIDER 1987 schematisch beschrieben (Kornfeld & Kornfeld 1985; Hirschberg & Snider 1987). Für die N-Glykane sieht dieser wie folgt aus:

- I. Synthese eines 'precursor'-Oligosaccharids (= ein Heteroglykan aus 14 Monosacchariden) an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (= ER):
 - initialisiert durch Dolicholphosphat-Anlagerung an die Lipidstruktur der ER-Membran;
 - unter Katalyse durch eine Glykosyltransferase Anlagerung von Uridin-Diphosphat-N-Acetylglukosamin an Dolicholphosphat, wobei Uridin-Monophosphat (= UMP) frei wird und N-Acetylglukosaminyldiphosphoryldolichol zurückbleibt;
 - weitere Anlagerungen von Monosacchariden, so dass am Schluss 2 N-Acetylglukosamin (= GlcNAc), 9 Mannose- (= Man) und 3 Glukose- (= Glc) Moleküle das 'precursor'-Oligosaccharid, auch 'high-mannose-type-glykan' genannt, bilden.

- II. Durch gewisse Umbauvorgänge des 'high-mannose-type' entstehen N-Glykane vom 'complex-type' bzw. 'hybrid-type'; einen zentralen 'core-type' (= $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$) behalten alle drei Typen gemeinsam bei.

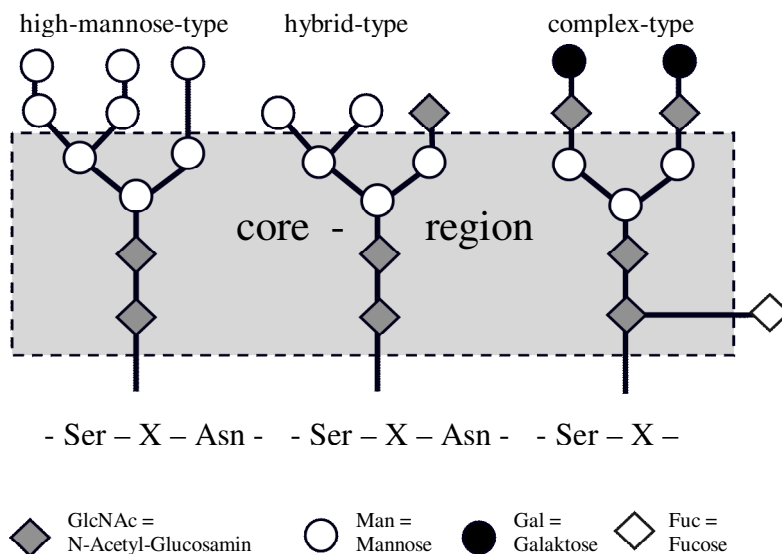


Abbildung 4: Strukturen der Haupttypen von N-Glykanen (Kornfeld & Kornfeld 1985)

- III. Das 'precursor'-Oligosaccharid wird als Ganzes auf einen Asparagin-Rest übertragen, wobei Dolicholphosphat frei wird.
- IV. Die endgültige Gestaltung vollzieht sich mit Hilfe von Glykosyltransferasen. Der Glykosylrest wird via N-glykosidischer Bindung und durch Kopplung an Nukleosiddiphosphat an das 'acceptor'-Protein gebunden und ggf. im Golgi-Apparat verlängert.

- V. Die Addition von Sialinsäure, Sulphat- oder Phosphatresten beendet die Kettenverlängerung (Capasso et al. 1984).

Die O-Glykane werden grundsätzlich wie die N-Glykane synthetisiert. Jedoch durchlaufen sie weniger komplizierte Zwischenschritte im ER und weniger streng geordnete Reihenfolgen bei der Glykankettenbildung:

- VI. Es findet eine direkte Kopplung eines Glykosylrests an Seryl oder Threonin im Golgi-Apparat, d.h. keine ER und Dolichol-Beteiligung, statt.

Insgesamt differieren die Glykokonjugate in ihren terminalen und inneren Glykanstrukturen, in der Anzahl, der Art und der Reihenfolge der Monosaccharide innerhalb eines Glykans sowie in der Art der Glykan-Aminosäure-Verknüpfung. Untersuchungen zeigen, dass durch die Glykoproteinsynthese z.B. in der Glandula parotidea bei verschiedenen Säugetierspezies und innerhalb einer Art in unterschiedlichen Gewebsarealen eine große Variabilität der Zusammensetzung der endständigen Kohlenhydratanteile mit spezifischen Lektinbindungseigenschaften möglich ist (Accili et al. 1992). Bei der Glandula parotidea handelt es sich um eine seröse Drüse, deren Glykoproteine zumeist O-glykosidisch verknüpfte Glykane enthalten, wie auch der Gesamtspeichel zum größten Teil O-glykosidisch verknüpfte Glykane aufweist (Carpenter & Procter 1999). Auch die Glandulae submandibulares /-linguales integrieren als gemischte Drüsen seröse, O-glykosidische Anteile. Lektin-Mess-Studien belegen eindeutig eine Vielzahl von Zuckerresten in den serösen Zellen und mukösen Tubuli der Glandula submandibularis (Pinkstaff 1993). Mit dem Aufkommen histochemischer Färbemethoden zur Demonstration von Glykokonjugaten und Licht- sowie Elektronenmikroskopischen Methoden zur Beobachtung von Lektin-Zucker-Bindungen im Speichel ist es möglich zu zeigen, dass seröse Drüsenzellen Glykokonjugate synthetisieren und diese in sekretorischen Granula gelagerten Strukturen sezernieren (Pinkstaff 1993).

3.4.3.6.2 Funktionen von Glykoproteinen

Glykoproteine erfüllen insgesamt die unterschiedlichsten Funktionen und weisen untereinander auch überlappende Funktionsbereiche auf. Alle Zellen der Eukaryonten tragen auf ihren Plasmamembranen Glykokonjugate, die u.a. der intrazellulären Erkennung dienen (Stryer et al. 2003). Einige Funktionsmöglichkeiten beispielhafter Glykoproteine im menschlichen Körper zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: einige Glykoproteine und ihre Funktionen (Montgomery et al. 1990)

Funktion	Glykoprotein
<i>Enzym</i>	Ribonuclease B, Prothrombin, β -D-Glukuronidase
<i>Transport</i>	Ceuloplasmin, Transferrin
<i>Hormon</i>	Thyroglobulin, Erythropoetin, Chorogonadotropin
<i>Immunsystem</i>	γ -Globulin, Blutgruppensubstanzen, HLA-Antigene
<i>Plasma & Körpersekrete</i>	Fibrinogen, Mukus

Immunologische Eigenschaften zeigen Glykoproteine durch unspezifische und spezifische, dem Glykananteil zuzuschreibende Abwehrmechanismen (Lamblin et al. 1991). Der unspezifische Schutzmechanismus der Glykoproteine äußert sich wahrscheinlich durch mechanische Eigenschaften (Börsch 1984). Hingegen basiert das spezifische Abwehrsystem auf einer Abhängigkeit zwischen Oligosacchariden und Lektinen (Kage et al. 1995). Zahlreiche Studien beschreiben verschiedenste spezifische Kopplungen zwischen bestimmten bakteriellen Lektinen und einzelnen Glykanen (Demuth et al. 1990a + b, Gibbons 1986 + 1979, Kishimoto et al. 1991, Hajishengallis et al. 1994, Ligtenberg et al. 1990b). Wu et al. haben 1988 eine Übersicht der bekannten Lektine und ihrer Bindungsspezifität erstellt (Wu et al. 1988) (siehe 4.3.2.2, Tabelle 7).

Die Glykoproteine als Substrat für Interaktionen mit Bakterien (Levine et al. 1987) ergeben eine Schutzfunktion für alle oralen Mukosaoberflächen. Im Gegenzug bedingt z.B. ein Rückgang von Speichelglykanen ein überschießendes Wachstum von *Candida* im Mundraum (Tanida et al. 2003). Glykane sind genetisch determiniert und auf Zelloberflächen, im exokrinen Sekret sowie im 'Pellicle' bzw. in der Plaque (Rittman et al. 1982, Holgersson et al. 1988) zu finden. Die Bindung zwischen ihnen und den bakteriellen Lektinen ist inhibierbar (Gibbons & Dankers 1982, Freter & Jones 1988, Kage et al. 1995). So erweisen sich im Speziellen auch Bindungen bakterieller Lektine an Oberflächen-gebundene Kohlenhydrate durch im Speichel gelöste Oligosaccharide oder Glykokonjugate als kompetitiv hemmbar. Eine Besiedlung der oralen Oberfläche über die bakteriellen Lektine ist somit eingeschränkt bzw. nicht mehr möglich (Gibbons & Qureshi 1979). Eine Studie hat ergeben, dass der Speichel kariesfreier Kinder eine höhere Konzentration an β -D-Galaktosyl-Reste-tragenden Glykanen enthält als Speichel von Kindern mit hoher Karies- bzw. bakterieller Aktivität. Unter dem Aspekt, dass die Adhäsion von *S. mutans* durch diese Glykane behindert wird, wäre eine Korrelation zwischen dem Glykangehalt und der Kariesinzidenz denkbar (Seemann et al. 2001). LEOUS & BELASOVA gelang es bereits 1995, einen positiven Zusammenhang zwischen der Spinnbarkeit, d.h. dem mukösen Charakter, des Speichels, welcher sich an Hand der

gebundenen Sialinsäuren als Marker für den Muzingehalt nachweisen lässt (Tammiala Salonen & Söderling 1993), und der Kariesprävalenz darzustellen (Leous & Belasova 1995). Eine reaktive Steigerung der Mukusproduktion durch Exposition der Schleimhaut gegenüber potentiell schädigender Noxen konnte bislang im Intestinaltrakt und im Nasalbereich nachgewiesen werden. Der Begriff 'intramural reflex' wurde als Umschreibung dieses reflektorischen, c-Faser-vermittelten Zusammenspiels eingeführt (Jaup et al. 1998, Jodal et al. 1993, Liewellyn-Smith 1987, Lundgren et al. 1988). Selbst die Mukusproduktion der Intestinalschleimhaut bei Säureexposition scheint sich nicht über das enterische Nervensystem sondern über einen 'intramural reflex' zu vollziehen (Timar Peregrin et al. 1999). Ob solch ein 'intramural reflex' als Schutz gegenüber Mikroorganismen oder anderen Substanzen ebenfalls im Mundraum existiert, ist durch Studien bislang noch nicht belegt. Im Vergleich zum Antigen-spezifischen sekretorischen IgA ist beim Oligosaccharid-abhängigen Schutz keine Erst-Immunisierung notwendig. Demzufolge wäre ein Wirkmechanismus der Glykoproteine gegenüber bakteriellen Angriffen bzw. Noxen im Rahmen einer reflektorischen Abwehr und im Sinne einer so genannte 'first line of defence' denkbar.

3.5 Ziel der Untersuchung

Aus der Literaturrecherche geht hervor, dass Speichel eine Vielzahl von unterschiedlichen Glykokonjugaten aufweist. Diese sind u.a. in der Lage, spezifisch an bakterielle Lektine zu binden, und deren Adhärenz an orale Oberflächen zu inhibieren. Die bakterielle Beteiligung an der Bildung des 'Pellicle' und der Plaque ist jedoch eine Grundvoraussetzung für die spätere Entwicklung von Karies und Parodontitis.

Aufgrund der quantitativen und strukturellen Unterschiede der Speichelglykane wird als Ziel der Arbeit angestrebt, ihre reflektorische Veränderung in Bezug auf eine ansteigende Bakterienzahl in der Mundhöhle aufzuzeigen.

Des Weiteren sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- in wie weit ändern sich die Speichelmengen bei ansteigender bakterieller Belastung?
- in wie weit ändern sich der Glykananteil und die Speichelmenge während einer Stimulation des Speichels?
- in wie weit sind die verschiedenen Speicheldrüsen an der Glykokonjugatsynthese beteiligt?
- in wie weit lässt sich die Existenz einer 'first line of defence' mit Hilfe einer Verschiebung von prozentualen Glykokonjugatfraktionen bei einer erhöhten bakteriellen Belastung belegen?

4 Material und Methoden

4.1 Vorbereitende Maßnahmen

4.1.1 Probandengut

Als Probanden stellten sich 14 Personen im Alter von 22 bis 37 Jahren zur Verfügung. Es handelte sich dabei um Studenten der Zahnheilkunde, Campus Virchow-Klinikums der Charité – Universitätsmedizin Berlin, sowie Patienten des Zentrums für Zahnmedizin, Campus Virchow – Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Einschlusskriterien für die Teilnahme waren:

- männliches Geschlecht;
- allgemeinmedizinische Unauffälligkeit;
- keine dauerhafte Medikation;
- Abstinenz in Bezug auf Nikotin;
- keine offenen kariöser Läsionen;
- keine aktiven Parodontopathien;
- mindestens 24 vorhandene Zähne.

4.1.2 Eingangsuntersuchung

Zu Beginn erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Probanden über den Versuchsinhalt und –ablauf. Nach schriftlicher Einwilligung begann die Versuchsreihe mit einer Erstellung des Zahnbefundes über die Anzahl vorhandener und fehlender Zähne. Im Verlauf der Studie wurde insgesamt an fünf Tagen Speichel entnommen, wobei ebenfalls der Plaqueindex (modifiziert nach Quigley & Hein (= QH) 1962) und ein gingivaler Blutungsindex (Papillen-Blutungs-Index (= PBI) nach Mühlemann & Sohn 1971) erhoben wurden.

4.1.3 Abschlussuntersuchung

Am fünften und letzten Kontrolltag der Studie erhielten die Probanden nach der Befunderhebung des Plaque-Zuwachses und der gingivalen Blutungsneigung sowie der Speichelabnahme eine ausgiebige professionelle Zahnreinigung.

4.2 Klinischer Teil

Die klinische Versuchsreihe erstreckte sich über einen Zeitraum von 14 Tagen. Jeder Proband

wurde dazu angehalten, sich zur gleichen Uhrzeit vorzustellen; und zwar jeweils um 18:00 Uhr. Das Essen im Allgemeinen und Trinken von koffein-, teein-, zucker- und säurehaltigen Getränken sollte ab drei Stunden vor Versuchsbeginn unterbleiben. Unter Beibehaltung ihrer jeweiligen individuellen Mundhygienemaßnahmen erschienen die Probanden zu zwei Terminen – an Tag „x“ sowie an Tag „x+2“. Ab Tag „x+5“ sollten die Probanden Abstinenz in Bezug auf jegliche Mundhygienemaßnahmen zeigen; auch Kaugummi-Kauen war untersagt. Die Zahnbürsten wurden eingesammelt und verwahrt. Die klinische Versuchsreihe setzte sich nun an den Tagen „x+5“, „x+8“ und „x+13“ fort. Insgesamt enthielten sich die Probanden an neun aufeinanderfolgenden Tagen der Mundhygiene.

Zu Beginn eines jeden Versuchstages erfolgte vor der Speichelentnahme sowohl die Bestimmung des modifizierten QH, als auch die Ermittlung des PBI. Diese wurden konsequent durch den gleichen Untersucher erhoben. Eine professionelle Zahnreinigung stellte für die Probanden an Tag „x+13“ den Abschluss der Studie dar.

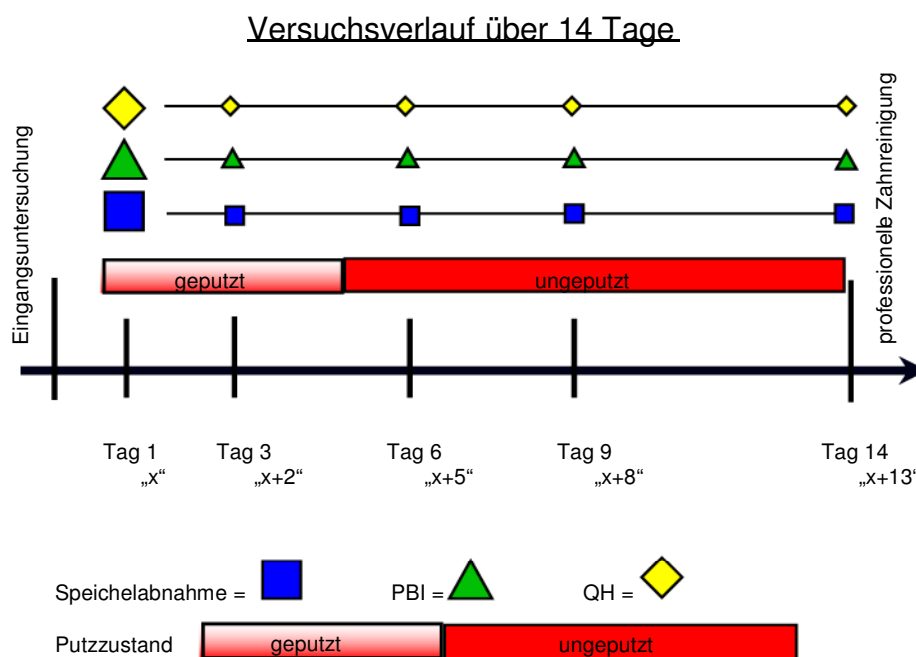


Abbildung 5: Versuchsverlauf: Binnen 2 Wochen wurde an 5 Tagen jeweils der Speichel abgenommen und der QH sowie der PBI bestimmt.

4.2.1 Bestimmung der Hygienestaten

Eine Kontrolle der quantitativen bakteriellen Zunahme im Rahmen der Versuchsreihe fand durch die Ermittlung des Plaqueindex ihren Ausdruck. Eine gegebenenfalls entstehende

gingivale Entzündung wurde mit Hilfe des parodontalen Blutungsindex registriert.

4.2.1.1 Plaqueindex nach QUIGLEY & Hein (= QH)

Der Plaqueindex nach QUIGLEY & HEIN bewertet die flächenhafte Verteilung der Plaque auf den buccalen und lingualen Zahnflächen nach Anfärben mit einem Plaquerevelator (Quigley & Hein 1962). Im Rahmen dieser Studie wurde von einer Anfärbung der Zahnoberflächen abgesehen. Das Plaquewachstum wird in sechs Grade von 0 bis 5 eingeteilt, wobei sich der QH-Index aus der Formel „Summe der Bewertungsgrade dividiert durch die Anzahl der bewerteten Flächen“ berechnet. In dieser Versuchsreihe fanden im ersten und dritten Quadranten die vestibulären Flächen sowie im zweiten und vierten Quadranten die lingualen Flächen der Zähne 1, 2, 6 und 7 Beachtung.

Tabelle 5: Schweregradeinteilung der Plaquebefunde nach QUIGLEY & HEIN

Grad	Diagnose
0	keine Plaque
1	vereinzelt Plaqueinseln am Gingivalsaum
2	durchgezogene Plaquelinie am Gingivalsaum
3	Ein Drittel der vestibulären Zahnfläche ist mit Plaque bedeckt.
4	Zwei Drittel der vestibulären Zahnfläche sind mit Plaque bedeckt.
5	Mehr als zwei Drittel der vestibulären Zahnfläche sind mit Plaque bedeckt.

4.2.1.2 Papillenblutungsindex nach MÜHLEMANN & SON (= PBI)

Der Entzündungszustand der Gingiva lässt sich mit Hilfe des Papillen-Blutungs-Index nach MÜHLEMANN & SON bestimmen (Mühlemann & Son 1971). Eine Blutung wird provoziert, indem mit einer stumpfen Parodontalsonde der Sulcus gingivae mit leichtem Druck ausgewischt wird. Die Intensität der auftretenden Blutung wird in vier Grade eingeteilt. Der PBI lässt sich aus „Blutungszahl dividiert durch die Anzahl der untersuchten Papillen“ ermitteln, wobei in dieser Studie im ersten und dritten Quadranten die Zähne 1, 2, 6 und 7 von lingual und im zweiten und vierten Quadranten die Zähne 1, 2, 6 und 7 von buccal sondiert wurden.

Tabelle 6: Gradeinteilung des Blutbefundes laut PBI

Blutungsgrad	Diagnose	Diagnosekriterien
0	keine Blutung	20-30 Sekunden nach der Reizung kein Blut erkennbar
1	Blutpunkt	20-30 Sekunden nach der Reizung nur ein einziger Blutpunkt erkennbar
2	Blutpunkte / Blutlinie	mehrere Blutpunkte oder feine Blutlinie erkennbar
3	Interdentaldreieck	Das Interdentaldreieck füllt sich mit Blut.
4	Tropfenbildung	profuse Blutung: Sofort nach der Sondierung füllt das Blut das interdentale Dreieck und fließt über die Zähne bzw. die Gingiva.

4.2.2 Gewinnung der Speichelproben

4.2.2.1 *Beschaffung der Apparatur zur Speichelabnahme*

Zur Gewinnung des Speichels stand eine Apparatur zur Verfügung, die Dr. Mathias Jancke im Rahmen seiner Dissertation konstruierte und als Duplikat der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin, Campus Virchow – Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin, überlassen hatte (Jancke 2002).

4.2.2.2 *Konstruktion der Apparatur zur drüsenspezifischen Speichelgewinnung*

Die speziell zur drüsenspezifischen Entnahme der Speichelproben entwickelte Apparatur besteht aus sechs Silikonsaugern, die über Silikonschläuche mit einer Unterdruckbox verbunden sind. Innerhalb der Dichtfläche der Sauger ist ein Messingdrahtgitter eingearbeitet. Damit wird verhindert, dass die bewegliche Mukosa in den Hohlraum eingesaugt wird und den Schlauchanschluss verschließt.

In der Unterdruckbox sind in einem Ständer die den Speichel auffangenden Probengefäße untergebracht, in die das Durchtrittsrohrchen der jeweiligen Entnahmestelle mündet. Der Unterdruckanschluss wird mit dem Speichelsaugeranschluss der zahnärztlichen Behandlungseinheit verbunden, so dass sich ein Unterdruck von –5 mmHg aufbaut.

Für den Unterkiefer sind zwei Sauger an einen frontal ausgeschnittenen Abformlöffel befestigt, um zwei Entnahmestellen zu erreichen. Die zwei 2,5 x 0,8 cm großen nierenförmigen Sauger decken lingual jeweils die Caruncula und Plica sublingualis ab. Es kann dadurch der Speichel

der großen Unterkieferdrüsen nach links und rechts getrennt entnommen werden. Um eine störungsfreie Entnahme des sublingualen Sekrets trotz seiner hohen Viskosität zu erreichen, mussten Silikonschläuche mit 2 mm Innendurchmesser eingesetzt werden. Durch die Befestigung der ableitenden Schläuche der Submandibularis-sauger an einem zurechtgeschnittenen Abformlöffel bleiben die Sauger in ihrer Position etwas flexibel und passen sich beim Einsetzen automatisch den anatomischen Platzverhältnissen an. Eine optische Kontrolle ist jederzeit möglich. Für die Glandula parotidea kommt jeweils ein runder Sauger mit 2 cm Durchmesser befestigt an einem 1 mm im Innendurchmesser messenden Schlauch zum Einsatz. Dieser wird auf die Papilla parotidea gesetzt und findet durch den Unterdruck an seinem Platz Halt.

Es war somit möglich, den Speichel der großen Drüsen vollständig und gleichzeitig sowie nach Ausführungsgängen getrennt zu entnehmen.

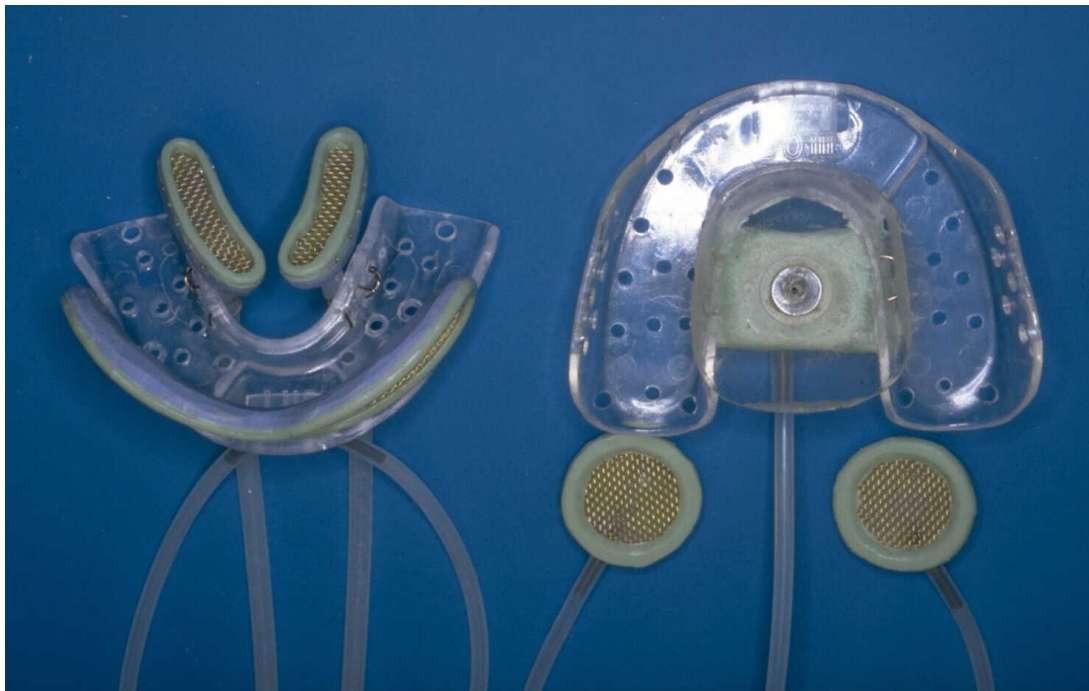


Abbildung 6: Darstellung der Speichelsauger der Apparatur zur drüsenspezifischen Speichelgewinnung: Für diese Studie kamen Sauger zur Gewinnung des Unterzungensekrets der Glandulae submandibulares /-linguales (siehe Abbildung links oben, inkl. des modifizierten Abformlöffels) und zur Gewinnung des Parotissekrets (siehe Abbildung rechts unten) zum Einsatz. Die Darstellung zeigt des Weiteren Sauger für den Bereich des Unterkiefervestibulums (siehe Abbildung links unten) sowie einen im Oberkieferabformlöffel integrierten Sauger zur Gewinnung des vestibulären und palatinalen Sekrets der Glandulae minores des Mundraums, die jedoch keine Anwendung fanden.

4.2.2.3 Vorgehensweise bei der Speichelabnahme

Nach der Bestimmung von QH und PBI wurde der Proband aufgefordert in dem Stuhl der zahnärztlichen Einheit entspannt Platz zu nehmen.

Die gereinigte, sterilisierte und getrocknete Apparatur wurde vor dem Einsetzen in den Mund komplett zusammengesetzt und an den aktiven Unterdruck angeschlossen. Im Anschluss erfolgte die Applikation der Sauger der eingeschalteten Apparatur zur Speichelgewinnung an den jeweiligen Speicheldrüsen. Zuerst wurden die Sauger für den Parotisspeichel adaptiert, danach der Unterkieferlöffel eingebracht.



Abbildung 7: Darstellung der sich in Aktion befindlichen Apparatur zur drüsenspezifischen Speichelgewinnung: Der Proband sitzt entspannt auf dem Stuhl der zahnärztlichen Einheit, die Apparatur ist über die ableitenden Silikonschläuche mit dem Probanden und zur Gewinnung des Unterdrucks mit dem Suktur der Einheit verbunden.

Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde der unstimulierte Speichel in den dafür vorgesehenen Auffanggefäßen gesammelt. Danach wurden die Sauger kurzzeitig aus dem Mund des Probanden entfernt. Nachdem sich durch den Luftzutritt der Inhalt der Schläuche in die Probengefäße binnen einer 2minütigen Leerlaufzeit entleert hatte, wurden diese aus der Unterdruckbox entnommen, verschlossen und durch neue ersetzt. Nachfolgend wurden die Speichelsauger an die entsprechenden Stellen im Mundraum reponiert. Um eine Stimulation der Speicheldrüsen zu erreichen, wurden dem Probanden einmalig fünf Tropfen einer 2%igen

Zitronensäurelösung auf die Mitte des Zungenrückens geträufelt. Erneut erfolgte eine 20minütige Abnahme. Nach Ablauf der Zeit wurden die Sauger aus dem Mund des Probanden entfernt, ein Abfließen des Restspeichels aus den Silikonschläuchen in die Auffanggefäße gewährleistet, die mit Speichel angefüllten Gefäße verschlossen und die Versuchsperson verabschiedet.

4.3 Labortechnischer Teil

4.3.1 Behandlung der Speichelproben

Vor der Speichelabnahme wurde das mittlere Gewicht eines Speichelgefäßes durch eine Laborwaage ermittelt, das später vom jeweiligen Gesamtgewicht des Ruhe- und Reizspeichels subtrahiert wurde. Somit ergab sich die produzierte Speichelmenge der entsprechenden Drüsen. Nach der Speichelentnahme wurden die Speichelnährchen sofort ausgewogen und in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C 15 Minuten lang mit 6.000 U/min zentrifugiert. Um eine Systematik aller Speichelproben über den gesamten Versuchsverlauf zu gewährleisten, wurde jedes jetzt zur Verwendung kommende „Greiner“-Röhrchen mit einer Registriernummer versehen. In dieser waren die Angaben über den Probanden, den Tag der Speichelabnahme, die Art des Speichels (stimuliert – unstimuliert) und die jeweilige Speicheldrüse enthalten. Von dem gewonnenen Ruhe- und Reizspeichel wurden 3 mal 200 µl Speichel abpipettiert, in das entsprechend markierte Röhrchen gegeben und in einem Gefrierschrank bei –80 °C bis zur Laboranalyse gelagert. Während des zwischenzeitlichen Transports der Proben vom Probanden zur Zentrifuge und von der Zentrifuge zum Gefrierschrank fand stets eine Kühlung mit Trockeneis statt. Der verbliebene Restspeichel wurde verworfen.

4.3.2 Labortechnische Durchführung

Die labortechnische Verarbeitung der Speichelproben fand in einem Zeitraum von sechs Wochen fortlaufend statt.

4.3.2.1 *Glykanstrukturbestimmung des Speichels*

Zur Charakterisierung und Spezifizierung der Glykanstrukturen des gewonnenen Speichels kam ein kompetitiver „Lektinbindungs-Inhibitionstest“ (Kage 1989) zum Einsatz. Dieser beruht auf dem Prinzip der Prohibition der Bindung eines biotinylierten, pflanzlichen Lektins mit bekannter Bindungsspezifität an den Glykananteil eines Festphasen-adsorbierten Neoglykoproteins durch den Glykananteil einer Probe. Durch die Menge des gebundenen Lektins ist das Ausmaß der kompetitiven Hemmung ermittelbar. Das Biotin-markierte Lektin bindet an die Streptavidin-

Peroxydase, welche ihrerseits eine Farbreaktion katalysiert. Deren Intensität kann später photometrisch gemessen werden und steht in direktem Zusammenhang zur Menge des Festphasen-gebundenen Lektins.

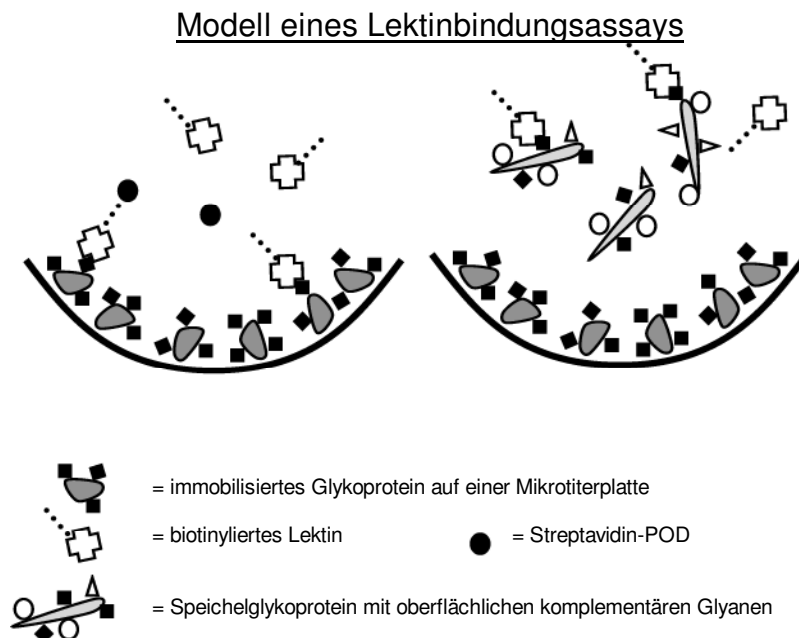


Abbildung 8: „Lektinbindungs-Inhibitionstest“:

links: **Biotinylierte Lektine binden spezifisch an immobil an eine Mikrotiterplatte fixierte Glykoproteine. Der quantitative Nachweis der Anlagerung erfolgt über das Streptavidin-Peroxidase-System.**

rechts: **Speichelglykoproteine inhibieren durch Bindung der Lektine über ihre spezifischen Glykananteile deren Anlagerung an die Festphasen-glykoproteine.**

4.3.2.2 Praktisches Vorgehen

Die Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Glykanstrukturen des Speichels wurde auf 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. In Vorversuchen wurden die optimalen Verdünnungen für jeden Schritt empirisch festgelegt und während des gesamten Versuchsverlaufes beibehalten. Auf eine Platte konnten maximal 20 Speichelproben, d.h. der an allen Versuchstagen gesammelte unstimulierte oder stimulierte Speichel eines Probanden, aufgetragen werden. Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine Standardkurve erstellt und eine Verdünnungsreihe einer Kontrollprobe (unverdünnt und 1:3 verdünnt) gemessen. Die Kontrollmessung diente der internen Qualitätssicherung. Insgesamt kamen von 14 Probanden maximal 560 Speichelproben zur Auswertung.

Das folgende Schema zeigt die räumliche Aufteilung einer Mikrotiterplatte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert		Probe 1 (1:7,5)		Probe 5		Probe 9		Probe 13		Probe 17	
B	Standard		Pr.obe 1 (1:37,5)									
C	Standard		Probe 2		Probe 6		Probe 10		Probe 14		Probe 18	
D	Standard											
E	Standard		Probe 3		Probe 7		Probe 11		Probe 15		Probe 19	
F	Standard											
G	Kontr. (unverd.)		Probe 4		Probe 8		Probe 12		Probe 16		Probe 20	
H	Kontr. (1:3)											

Abbildung 9: Schema der räumlichen Aufteilung einer Mikrotiterplatte bei der Durchführung eines kompetitiven „Lektinbindungs-Inhibitionstests“, wobei jede Probe doppelt und in zwei Verdünnungen gemessen wurde. Die Kontrolle wurde doppelt unverdünnt und in 1:3 Verdünnung aufgetragen. Zehn Proben entsprechen jeweils dem unstimulierten oder stimulierten Speichel aller Drüsen eines Probanden an allen Tagen.

Der erste Schritt bestand in der Beschichtung der Platten mit dem für das jeweilige Lektin komplementäre Glykoprotein in einer Verdünnung von 1:1.000 in frischem Phosphatpuffer. Jedes Well der Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl beschickt und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf einem Schüttler (ca. 200 U/min) inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der Standardreihen und Speichelproben.

Die Proben wurden nach dem Auftauen und einem dreiminütigen Zentrifugieren bei 14.000 U/min zunächst mit Probenpuffer im Verhältnis 1:7,5 verdünnt. Im Anschluss folgte eine weitere zweite Verdünnung um den Faktor 5. Für die Ermittlung einer spezifischen Glykanstruktur wurde ein Teil der Probe bis zum Erhalt von vier Verdünnungen geometrisch weiterverdünnt.

Ein Kohlenhydrat bekannter Struktur bildete in fünf Verdünnungsstufen die Standardreihe; welche Kohlenhydrate mit welchem Verdünnungsfaktor jeweils Anwendung fanden, erläutert Tabelle 7.

Tabelle 7: Auflistung der im kompetitiven „Lektinbindungs-Inhibitionstest“ verwendeten Lektine mit ihrer Beschichtungsspezifität, der im jeweiligen Test eingesetzten Glykanstruktur und den entsprechenden Standards;

Legende:

geometr.Weiterverd. = geometrische Weiterverdünnung; Verd. = Verdünnung;

LPA = Lektinassay-Puffer, BSA = bovines Serum-Albumin, PBS = Phosphatpuffer

<u>Lektin</u> (Verdünnung in LPA)	<u>Bindungsspezifität</u> (nach WU et al. 1988)	<u>Beschichtung</u> - Verdünnung in PBS - (Produzent/Lieferant)	<u>Standard</u> - Verd. in Probenpuffer - - geometr.Weiterverd.Faktor -
PNA = Peanut Agglutinin (50 µg/l + 0,1% BSA)	β-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin	BSA-Gal-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin 1 mg/l (Janssen Biochemica, Beerse, Belgien)	N-Acetyl-Neuramin-Laktose 60µM Faktor 3
GS 1 = Griffonia simplicifolia Agglutinin (25 µg/l + 0,1% BSA)	terminales α-N-Acetyl-Galaktosamin	BSA-N-Acetyl-Galaktosamin 1 mg/l (Sigma Biochemica, Deisenhofen)	N-Acetyl-Galaktosamin 300mM Faktor 8
VVA = Vicia villosa Agglutinin (25 µg/l + 0,1% BSA)	terminales 1,3-N-Acetyl-Galaktosamin	BSA-Galaktosamin 1 mg/l (Sigma Biochemica, Deisenhofen)	N-Acetyl-Galaktosamin 300mM Faktor 8
SNA = Sambucus nigra Agglutinin (25 µg/l + 0,1% BSA)	terminale Sialinsäure	Fetuin 1 mg/l (Sigma Biochemica, Deisenhofen)	Methyl-α-D-Galaktopyranosid 300mM Faktor 2
AAA = Anguilla anguilla Agglutinin (25 µg/l + 0,1% BSA)	α 1,6 gebundene Fucose	BSA-Fucosylamide 1 mg/l (Sigma Biochemica, Deisenhofen)	Fucose 300mM Faktor 3

Ebenfalls wurde eine Kontrolle auf jede Mikrotiterplatte aufgebracht, die der internen Qualitätskontrolle und der Berechnung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten diene. Sie setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 8: Auflistung der in der Kontrolllösung enthaltenen Stoffe inklusive der jeweiligen Mengenangabe

<u>Zusammensetzung der Kontroll-Lösung</u>	
Fucose	25 mmol (123,15 mg)
N-Acetyl-Galaktosamin	10 mmol (66,36 mg)
N-Acetyl-Neuramin-Laktose	1:60 (500 µl)
Methyl- α -Galaktopyranosid	15 mmol (87,39 mg)

Nach Ablauf der Inkubationszeit fand ein viermaliges Waschen der Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Waschautomaten statt, an das sich das Auftragen von 25 µl Standard-, Kontroll- oder Proben-Lösung pro Well entsprechend dem Schema (siehe Abbildung 9) anschloss. Des Weiteren erfolgte eine Ergänzung der Wells mit 75 µl der Lektin-Lösung in der jeweiligen Verdünnung auf 100 µl. Im Anschluss wurden die Platten eine halbe Stunde bei 200 U/min geschüttelt und über Nacht in einem Kühlschrank bei +4°C erneut inkubiert.

Der nächste Tag begann mit dem viermaligen Waschen der Mikrotiterplatten. Darauf folgte ein Auffüllen aller Wells mit 100 µl Streptavidin-POD, welches im Verhältnis 1:20.000 in Lektinassay-Puffer verdünnt war, und eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler (ca. 200 U/min) bei Raumtemperatur.

Nach erneutem viermaligen Waschen wurde das im Gallati-Puffer frisch angesetzte TMB mit 110 µl je Well pipettiert und die Platten bei Dunkelheit ca. 10 Minuten inkubiert.

Sobald eine abgestufte Blaufärbung in den Wells sichtbar war, wurde dieser enzymatische Farbumschlag mit Hilfe von 50 µl einer 4NH₂SO₄-Lösung gestoppt und die dabei eingetretene Gelbfärbung im Photometer gemessen.

Abbildung 10 zeigt nochmals die einzelnen Schritte und den zeitlichen Ablauf des kompetitiven „Lektinbindungs-Inhibitionstests“ in einer Übersicht.

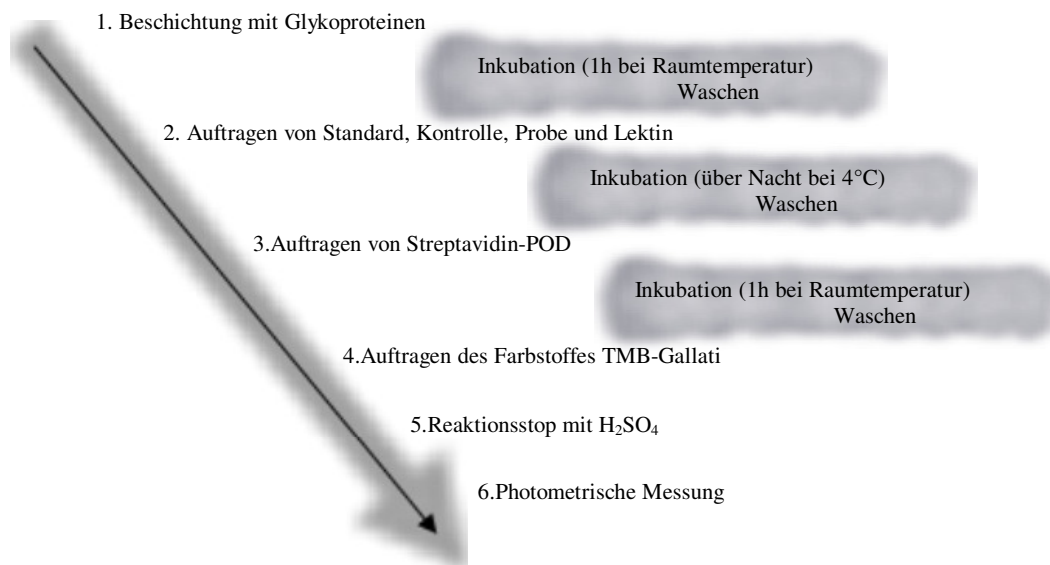


Abbildung 10: schematischer Ablauf des „Lektinbindungs-Inhibitionstests“

4.3.2.3 Konzentrationsmessung

Die Konzentrationsbestimmung der Glykanstruktur-Äquivalente erfolgte durch Messung der optischen Dichte mittels eines Spektralphotometers. Die Messungen wurden bei einer Messfilterwellenlänge von 450 nm und einer Referenzfilterwellenlänge von 490 nm durchgeführt, um eventuelle unterschiedliche Resorptionen der Mikrotiterplatten auszugleichen. Zunächst ergab sich eine halblogarithmische Standardkurve durch die auf jeder Platte vorhandene definierte Standardverdünnungsreihe.

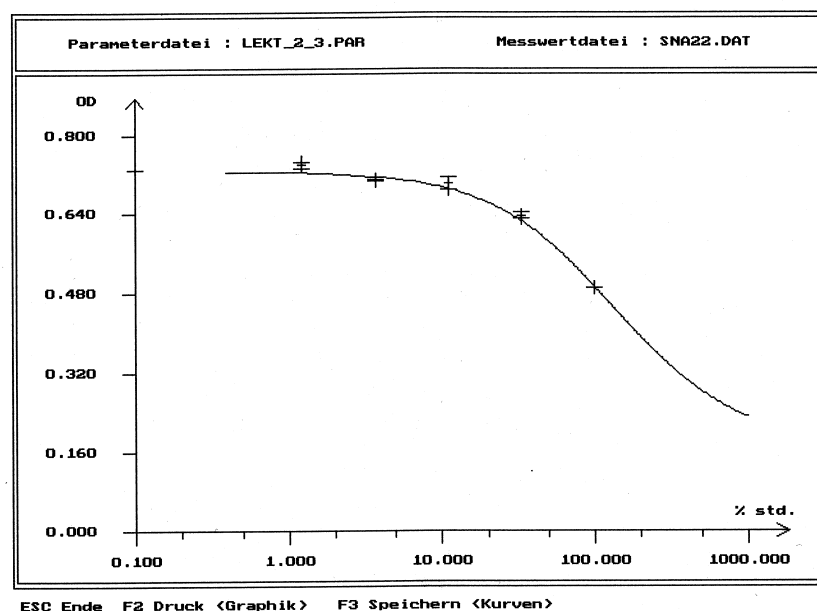


Abbildung 11: Standardkurve am Beispiel von SNA:

OD: die optische Dichte, %std.: der Prozentwert des Standards

Die Messwerte aller Wells wurden dann auf diesen Standard bezogen als Prozentwerte ausgegeben und pro verwendete Platte als Messwertdatei gespeichert. Als Dokumentation lag zum Schluss ein Ausdruck in Tabellenform vor.

4.3.3 Statistische Qualitätskontrolle

Um eine Qualitätskontrolle der auf mehreren Mikrotiterplatten an verschiedenen Tagen durchgeführten „Lektinbindungs-Inhibitionstests“ zu gewährleisten, wurde eine stets gleiche Kontrollprobe auf jeder Platte mitgemessen.

Aus den Messwerten dieser Probe wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für jeden Analysetag errechnet und zur weiteren Berechnung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK) herangezogen:

$$\text{VK [\%]} = \text{SD} / \text{MW} \times 100$$

SD = Standardabweichung; MW = arithmetrischer Mittelwert

Auf diese Weise ergibt sich für alle Tests der Inter-Assay-Variationskoeffizient entweder bezogen auf einen Analysetag oder auf alle Analysetage.

4.4 Statistischer Teil

Zur statistischen Berechnung diente das Programm SPSS 10.0 für Windows und ein IBM-kompatibler Rechner mit Pentium-IV-Prozessor. In der deskriptiven Statistik wurden verteilungsfreie Stichprobenparameter wie Mediane und Perzentile bestimmt. Als statistische Tests wurden nicht-parametrische Verfahren gewählt:

- für verbundene Stichproben einer Bestimmungsgruppe der Wilcoxon-Test
- für unverbundene Stichproben der Mann-Whitney-U-Test.

Die ermittelten Speichelmengen- und Konzentrationswerte wurden mit Hilfe des Friedman-Tests mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verrechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Struktur der Stichproben

Alle gewonnenen Speichelstichproben stammen von 14 männlichen, allgemeinanamnestisch unauffälligen, oral gesunden, nicht-rauchenden Probanden, welche an dem Zentrum für Zahnmedizin, Campus Virchow – Klinikum, Charité - Universitätsmedizin Berlin, studierten oder dort als Patienten vorsprachen.

Bei Betrachtung ihres Alters von 22 bis 37 Jahren ergab sich eine Altersdifferenz von 15 Jahren und ein Altersmittelwert von 27,8 Jahren mit einer Standardabweichung von 4,8 Jahren.

5.2 Klinische Befunde

5.2.1 Hygienestaten

Mit Hilfe eines modifizierten Plaqueindex nach QUIGLEY & HEIN (= QH) (Quigley & Hein 1962) wurde die Zunahme der Plaque auf den Zahnoberflächen registriert. Mit einem modifizierten Papillen-Blutungs-Index nach MÜHLEMANN & SON (= PBI) (Mühlemann & Son 1971) ergab sich ein Maß für die gingivale Entzündungsneigung. Die Größe beider Indices stellt einen absoluten Zahlenwert nach Aufsummierung der beobachteten Einzelwerte pro Zahn und Division durch die Zahnanzahl dar.

Als Ergebnisse der Mundhygienestaten wurden folgende Werte zusammengetragen und tabellarisch zur Erkennung ihres Verteilungsmusters als Median bzw. Perzentil 25 sowie 75 wiedergegeben:

Tabelle 9: modifizierter Plaqueindex nach QH der Probanden an den Versuchstagen

QH – Entwicklung - tabellarisch -

QH am Tag	Median	Perzentil 25	Perzentil 75
„X“	0,69	0,47	1,03
„X+2“	0,66	0,48	1,00
„X+5“	1,12	0,81	1,56
„X+8“	1,81	1,48	2,08
„X+13“	2,62	2,44	2,78

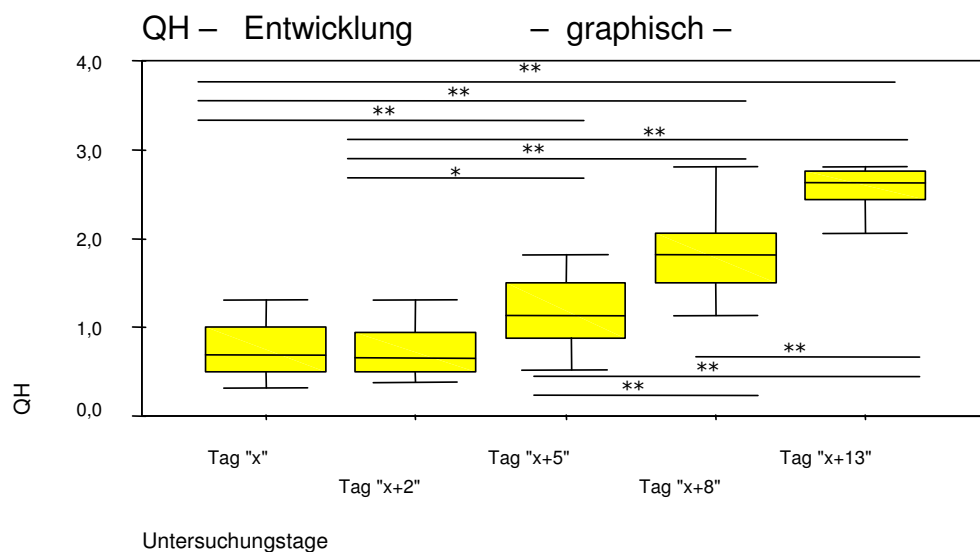


Abbildung 12: graphische Darstellung der Schwankungen um den Medianwert des modifizierten Plaqueindex nach QUIGLEY & HEIN an den entsprechenden Versuchstagen;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

Die ermittelten Durchschnittswerte des modifizierten Plaqueindex nach QUIGLEY & HEIN zeigen nach Aussetzen der Mundhygienemaßnahmen eine stetige Augmentation.

Die graphische Aufarbeitung der Werte des PBI erfolgte in gleicher Weise:

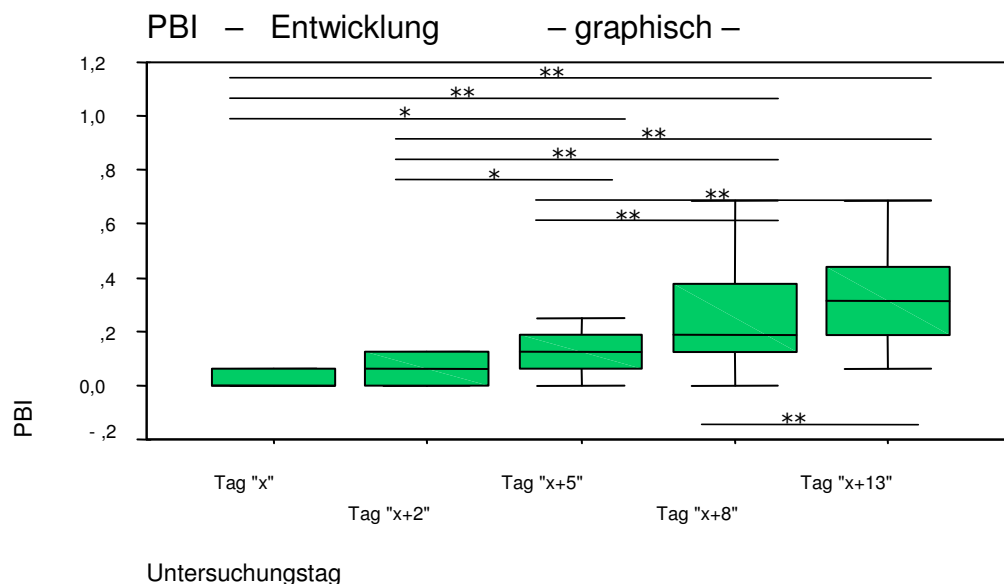


Abbildung 13: graphische Darstellung der Schwankungen um den Medianwert des modifizierten PBI an den entsprechenden Versuchstagen;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

Tabelle 10: modifizierter Papillen-Blutungs-Index nach MÜHLEMANN & SON der Probanden an den jeweiligen Versuchstagen

PBI – Entwicklung - tabellarisch -

PBI am Tag	Median	Perzentil 25	Perzentil 75
„X“	0,12	0,12	0,19
„X+2“	0,19	0,19	0,25
„X+5“	0,25	0,19	0,31
„X+8“	0,31	0,25	0,53
„X+13“	0,44	0,28	0,59

Es wird anhand der Medianwerte des modifizierten PBI deutlich, dass bei einer bestimmten Blutungsneigung im geputzten Zustand das Ausmaß der Papillenblutungen durch Aussetzen der Mundhygienemaßnahmen ab Tag „x+5“ signifikant zunimmt.

5.2.2 Speichelmengen

Die Mengen der entnommenen Speichelproben wurden nach dem Auswiegen durch Subtraktion der Leergewichte der Speichelprobengefäße errechnet und in Gramm pro Minute (g/min) angegeben. Wegen der Normalverteilung der gemessenen Werte und zum besseren Vergleich mit Literaturdaten fiel die Wahl des dargestellten Speichelmengenwertes auf den Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung.

Somit sind in den Tabellen 11 und 12 für die gewonnenen Speichelmengen der einzelnen Drüsen an den jeweiligen Untersuchungstagen die Mittelwerte inklusive ihrer Standardabweichungen in Gramm pro Minute zusammengestellt.

Tabelle 11 gibt die Speichelmengen im Ruhezustand wieder.

Tabelle 12 fasst die Speichelmengen nach erfolgter Stimulation zusammen. Der Stimulationsfaktor des entsprechenden Tages ist additiv im Überblick mit aufgelistet.

Tabelle 11: gemittelte Speichelmengen in Gramm pro Minute vor der Speichelstimulation

Ruhespeichel in (g/min)		Besuchstag „x“	„x+2“	„x+5“	„x+8“	„x+13“
Drüse	Seite	Mittelwert (Std.abweichung)	Mittelwert (Std.abweichung)	Mittelwert (Std.abweichung)	Mittelwert (Std.abweichung)	Mittelwert (Std.abweichung)
Glandula parotidea	rechts	0,12 (± 0,11)	0,10 (± 0,07)	0,09 (± 0,06)	0,10 (± 0,05)	0,09 (± 0,06)
	links	0,13 (± 0,12)	0,10(± 0,07)	0,10 (± 0,09)	0,09 (± 0,06)	0,13 (± 0,08)
	gesamt	0,25 (± 0,23)	0,20 (± 0,14)	0,19 (± 0,15)	0,19 (± 0,11)	0,22 (± 0,14)
Glandulae submand./- ling.	rechts	0,20 (± 0,11)	0,22 (± 0,16)	0,17 (± 0,10)	0,17 (± 0,10)	0,25 (± 0,16)
	links	0,21 (± 0,13)	0,23(± 0,15)	0,20 (± 0,13)	0,21 (± 0,11)	0,29 (± 0,13)
	gesamt	0,41 (± 0,24)	0,45 (± 0,31)	0,37 (± 0,23)	0,39 (± 0,21)	0,54 (± 0,29)
gesamt	rechts	0,32 (± 0,22)	0,32 (± 0,23)	0,26 (± 0,16)	0,27 (± 0,15)	0,34 (± 0,22)
	links	0,34 (± 0,25)	0,33 (± 0,22)	0,30 (± 0,22)	0,30 (± 0,17)	0,42 (± 0,21)
	gesamt	0,67 (± 0,47)	0,66 (± 0,45)	0,56 (± 0,38)	0,58 (± 0,32)	0,76 (± 0,43)

Tabelle 12: gemittelte Speichelmengen in Gramm pro Minute nach der Speichelstimulation inklusive des errechneten Stimulationsfaktors Δ gegenüber der Ruhespeichelmenge

Reizspeichel in (g/min)		Besuchstag „x“		„x+2“		„x+5“		„x+8“		„x+13“	
Drüse	Seite	Mittelwert (Std.abwei- chung)	Δ	Mittelwert (Std.abwei- chung)	Δ	Mittelwert (Std.abwei- chung)		Mittelwert (Std.abwei- chung)	Δ	Mittelwert (Std.abwei- chung)	Δ
Glandula parotidea	rechts	0,25 (\pm 0,16)	2,08	0,20 (\pm 0,13)	2,00	0,21 (\pm 0,10)	2,33	0,26 (\pm 0,12)	2,60	0,27 (\pm 0,10)	3,00
	links	0,22 (\pm 0,12)	1,70	0,22 (\pm 0,13)	2,20	0,20 (\pm 0,11)	2,00	0,23 (\pm 0,12)	2,56	0,27 (\pm 0,14)	2,08
	gesamt	0,46 (\pm 0,28)	1,84	0,42 (\pm 0,26)	2,10	0,40 (\pm 0,20)	2,11	0,49 (\pm 0,24)	2,58	0,55 (\pm 0,24)	2,50
Glandulae submand./- ling.	rechts	0,31 (\pm 0,14)	1,55	0,36 (\pm 0,07)	1,63	0,29 (\pm 0,10)	1,71	0,33 (\pm 0,13)	1,94	0,35 (\pm 0,11)	1,40
	links	0,30 (\pm 0,13)	1,42	0,29 (\pm 0,13)	1,26	0,32 (\pm 0,11)	1,60	0,33 (\pm 0,11)	1,57	0,34 (\pm 0,12)	1,17
	gesamt	0,60 (\pm 0,27)	1,46	0,65 (\pm 0,20)	1,44	0,60 (\pm 0,20)	1,62	0,65 (\pm 0,25)	1,67	0,69 (\pm 0,23)	1,28
gesamt	rechts	0,55 (\pm 0,30)	1,72	0,56 (\pm 0,20)	1,75	0,50 (\pm 0,20)	1,92	0,59 (\pm 0,25)	2,19	0,62 (\pm 0,21)	1,82
	links	0,52 (\pm 0,25)	1,53	0,51 (\pm 0,26)	1,54	0,51 (\pm 0,22)	1,70	0,56 (\pm 0,33)	1,87	0,61 (\pm 0,26)	1,45
	gesamt	1,05 (\pm 0,55)	1,57	1,08 (\pm 0,46)	1,64	1,00 (\pm 0,42)	1,79	1,14 (\pm 0,58)	1,97	1,24 (\pm 0,47)	1,63

Beim Vergleich der Tabelle 11 mit Tabelle 12 ist aufgrund detaillierterer Aufschlüsselung ersichtlich, dass die Speichelmenge im Versuchsverlauf nach Stimulation bis maximal auf einen dreifachen Mengenwert angestiegen ist. Ablesbar ist dies anhand des ebenfalls aufgeführten Stimulationsfaktors Δ , welcher sich durch die folgende Formel errechnen lässt:

$$\text{Stimulationsfaktor } \Delta = \frac{\text{Reizspeichel (g / min)}}{\text{Ruhespeichel (g / min)}}$$

Er stellt die gesteigerte Sekretion der entsprechenden Drüse in Form eines Zahlenwertes dar.

Beim jeweiligen Vergleich des Stimulationsfaktors Δ der rechten plus der linken Glandula parotidea mit den addierten rechten und linken Glandulae submandibulares /-linguales kristallisierte sich konstant ein höherer Wert für die Glandula parotidea heraus. Als Beispiel einer Drüse sei hier die erhöhte Speichelsekretion der Glandula parotidea am vierten Versuchstag erwähnt, die von 0,19 g/min auf 0,49 g/min anstieg. Dies entspricht einer vermehrten Sekretion von 158% bzw. einem Stimulationsfaktor Δ von 2,58. Des Weiteren zeigt sich bei Betrachtung der einzelnen Versuchstage ein stetiger Anstieg des Stimulationsfaktors Δ , der jedoch sowohl bei den Glandulae submandibulares /-linguales als auch bei der Glandula parotidea am Tag „x+13“ einen Rückgang erfährt.

Unter separater Betrachtung beider Stimulationszustände zeigen die Speichelmengen der unterschiedlichen Drüsen im Vergleich, dass die gewonnenen Mengen der Glandulae submandibulares /-linguales mindestens um den Faktor 1,30 am Tag „x“ und maximal 2,45 am Tag „x+13“ über der der Glandula parotidea liegen. Das entspricht einer Speichelmengendifferenz bei zu Grunde legen des Parotis-Werts von 30% bzw. 145%.

Sowohl die Glandula parotidea als auch die Glandulae submandibulares /-linguales weisen gleich welchen Stimulationszustands im Seitenvergleich rechts/ links keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Speichelmengensekretion auf.

Die individuellen Werte zeigen eine starke Streuung sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Speichelmengen. In den Tabellen 13 und 14 sind die Sekretionsunterschiede der Glandula parotidea und der Glandulae submandibulares /-linguales gemittelt auf die ersten zwei Abnahmetage zum einem im unstimulierten Zustand, zum anderen im stimulierten Zustand herausgearbeitet. Diese beiden Tage bilden die Vergleichswerte für den Versuchsverlauf. Die Probanden zeigten während dieser Tage ihre natürliche individuelle Speichelsekretion, bevor

eine Intervention im Mundraum durch Aussetzen der Mundhygiene eingeleitet wurde.

Tabelle 13: Streuung aller entnommener Speichelproben gemittelt über die ersten beiden Versuchstage im unstimulierten Zustand; im Vergleich die verschiedenen Drüsen (= N) beider Seiten in Gramm pro Minute

**Mengenübersicht der Speichelproben
der Vergleichstage „x“ und „x+2“ in unstimuliertem Zustand**

Speichelmenge (in g/min)	N	Min.	Max.	Mittelwert (± Std.Abw.)
Glandula parotidea	52	0,00	0,46	0,11 (± 0,09)
Gll.submand./-ling.	52	0,00	0,47	0,21 (± 0,13)

Tabelle 14: Streuung aller entnommener Speichelproben gemittelt über alle Versuchstage im stimulierten Zustand; im Vergleich die verschiedenen Drüsen (= N) beider Seiten Gramm pro Minute

**Mengenübersicht der Speichelproben
der Vergleichstage „x“ und „x+2“ in stimuliertem Zustand**

Speichelmenge (in g/min)	N	Min.	Max.	Mittelwert (± Std.Abw.)
Glandula parotidea	48	0,00	0,50	0,22 (± 0,13)
Gll.submand./-ling.	48	0,00	0,49	0,31 (± 0,12)

Beim Vergleich von gemittelten Ruhe- und Reizspeichelwerten über den gesamten Versuchsablauf sowie untergliedert bezüglich der verschiedenen Speicheldrüsen wurden Signifikanzen auffällig. Diese sind mittels „*“ in die nachfolgenden graphischen Darstellungen der über 20 Minuten gesammelten Speichelmengen eingearbeitet.

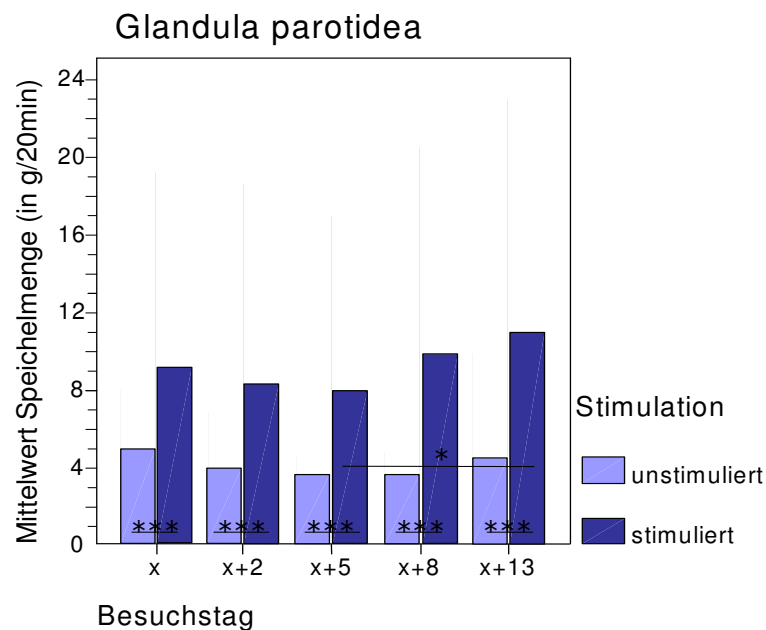


Abbildung 14: graphische Darstellung der Speichelmengen in g/20 Minuten der Glandula parotidea an den fünf Untersuchungstagen im Vergleich vor und nach Stimulation des Speichelflusses;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

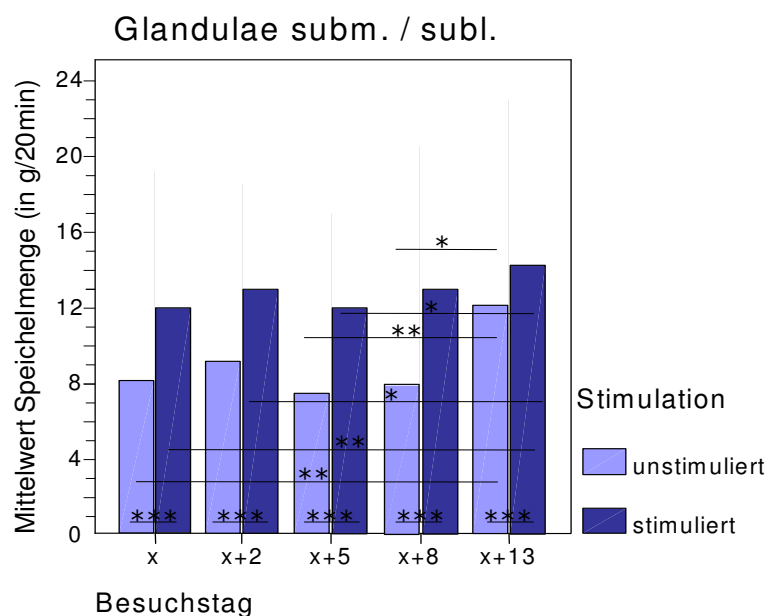


Abbildung 15: graphische Darstellung der Speichelmengen in g/20 Minuten der Glandulae submandibulares /linguales an den fünf Untersuchungstagen im Vergleich vor und nach Stimulation des Speichelflusses; Signifikanzen: siehe oben

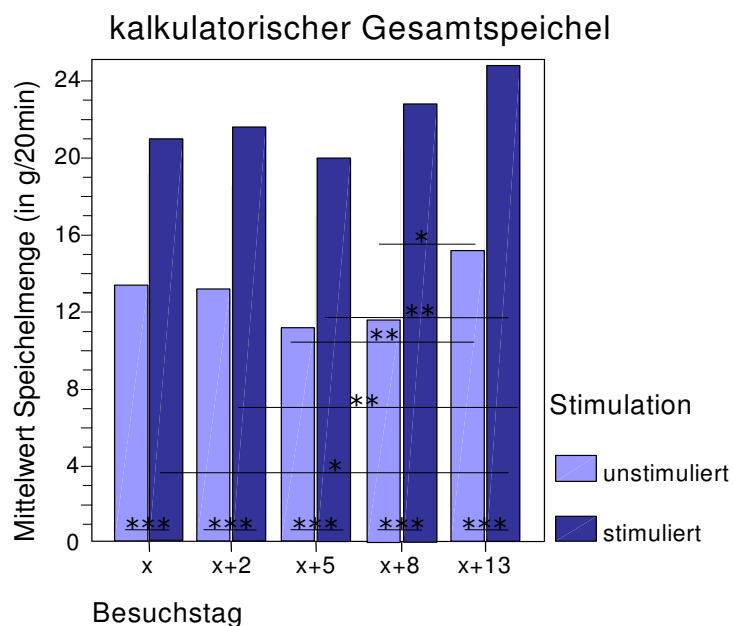


Abbildung 16: graphische Darstellung der kalkulatorischen Gesamtspeichelmengen in g/20 Minuten an den fünf Untersuchungstagen im Vergleich vor und nach Stimulation des Speichelflusses;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

Während der Tage unter Anwendung der habituellen Mundhygienemaßnahmen „x“ und „x+2“ war beim Vergleich innerhalb eines Stimulationszustandes keine Signifikanz zu erkennen.

Hingegen lagen die Speichelmengenwerte an allen Versuchstagen nach der Stimulation signifikant über den unstimulierten Werten.

Für die Glandula parotidea ergab sich nur ein signifikanter Anstieg nach erfolgter Stimulation von Tag „x+5“ zu Tag „x+13“. Für die Glandulae submandibulares /-linguales war hingegen auf Grund vieler Signifikanzen eine klare Entwicklung der Speichelmenge ersichtlich: Nach der Intervention durch das Aussetzen des Putzens an Tag „x+5“ zeichnete sich im Vergleich zu den Ausgangstagen „x“ und „x+2“ noch keine Signifikanz ab. An Tag „x+8“ zeigte sich jedoch eine Speichelmengenzunahme, auf die an Tag „x+13“ eine weitere folgte. Der Speichelmengenendwert an Tag „x+13“ lag signifikant über den Ausgangswerten an Tag „x“ und „x+2“ sowie signifikant über Tag „x+5“ und „x+8“.

Alle Signifikanzen, die sich für die Speichelmengenwerte binnen 20 Minuten ergaben, gelten ebenso für die entsprechenden Werte binnen einer Minute.

5.3 Labortechnische Befunde

Im Labor wurden unter Anwendung des „Lektinbindungs-Inhibitionstests“ die Konzentrationen fünf verschiedener, spezifischer Glykananteile im Speichel bestimmt. Photometrisch zeigte jede einzelne gewonnene Probe nach Zugabe eines Lektins ein bestimmtes Lektinbindungs-

Verdrängungspotential. Nach jeweiliger Durchführung des Tests mit den Lektinen 'PNA', 'GS1', 'VVA', 'SNA' und 'AAA' ergab sich die Speichelglykankonzentration in Form eines prozentualen Zahlenwertes.

Die Konzentration des Lektin-äquivalenten Rezeptors im Speichel ist der Faktor für seine antiadhäsive Potenz. Die Reaktion der Speicheldrüsen in Bezug auf ihre Glykosylierungsaktivität lässt sich erst mit Hilfe der relativen Sekretionsrate ermitteln, welche sich aus der Konzentration multipliziert mit der Speichelmenge bezogen auf die Entnahmezeit errechnet:

$$\text{relative Sekretionsrate} = \text{Lektinkonzentration} * \frac{(\text{Speichelmenge (g)})}{(\text{Entnahmezeit (min)})}$$

Zur optischen Verdeutlichung der Entwicklungen im Studienverlauf wurden Boxplot-Graphiken entworfen. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse der Glandula parotidea, die der Glandulae submandibulares /-linguales bzw. im Überblick zusammengefasst die Werte aller großen Speicheldrüsen beschrieben als kalkulatorischer Gesamtspeichel im Mundraum. Zum Vergleich innerhalb einer Graphik wurden die unstimulierten und stimulierten Speichelwerte im Versuchsverlauf aufgearbeitet. Um eine übersichtliche Darstellung zu präsentieren, wurde die Abweichung der Einzelwerte vom Median aller in der jeweiligen Graphik integrierten Messwerte errechnet und durch das Intervall zwischen dem 5. und 95. Perzentil dividiert. Somit ergab sich die relative Bindungskapazität:

$$\text{relative Bindungskapazität} = \frac{(\text{Einzelmesswert} - \text{Median aller Messwerte})}{(\text{Perzentil 95} - \text{Perzentil 5 aller Messwerte})}$$

Diese Rechenmethode fand Anwendung bei den graphischen Abbildungen der gewonnenen Konzentrations-Einzelmesswerte und der Sekretions-Einzelmesswerte. Mittels dieser Graphiken zeigen sich Konvergenzen und Differenzen der Ergebnisse in gut strukturierter Form: Übereinstimmende Werte gruppieren sich auf gleichem Niveau um die den Durchschnitt angegebende Nulllinie; Entwicklungen weichen hingegen mit ihrem Medianwert, der durch den zentral im Balken platzierten Strich wiedergegeben wird, in die positiven oder negativen Skalenbereiche ab. Um eine aussagekräftige Wertung vornehmen zu können, wurden die gemessenen Ausgangswerte statistisch auf signifikante Ergebnisse untersucht. Die sich ergebenden Signifikanzen wurden mit Hilfe von Markierungen in Form von Sternchen (= „*“) entsprechend in die Abbildungen eingefügt.

Der Übersicht halber sind abschnittsweise die Konzentrationen entsprechend ihrer

Lektinspezifität statistisch aufgearbeitet. Neben einer Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform, wo Medianwerte des Ruhe- bzw. Reizspeichels sowie die entsprechenden 25. und 75. Perzentile notiert sind, dienten auch graphische Schaubilder der Analyse des Lektinrezeptorenverhaltens. Durch die besondere Form der Graphiken waren auch Tendenzen erkennbar, obgleich messtechnisch nicht bei allen Vergleichen zwischen den einzelnen Untersuchungstag Signifikanzen nachgewiesen werden konnten.

Im Anschluss sind in gleicher Form die Sekretionsraten der an die fünf Lektine bindenden Speichelbestandteile zusammengestellt.

5.3.1 Betrachtung der Speichelkonzentrationen

5.3.1.1 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'PNA'

Auch die Untersuchung bezüglich des Lektin-Äquivalents 'PNA' zeigte Signifikanzen beim Speichel der Glandulae submandibulares /-linguales. Dort wurde im unstimulierten Zustand ein Konzentrationsabfall von Tag „x+2“ sowie „x+5“ auf Tag „x+13“ deutlich. Die Stimulation mittels Zitronensäure bewirkte an den Tagen „x+5“ und „x+8“ eine signifikante Konzentrationszunahme.

Weitere Werte im Bereich des kalkulatorischen Gesamtspeichels bzw. des Speichels der Glandula parotidea ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

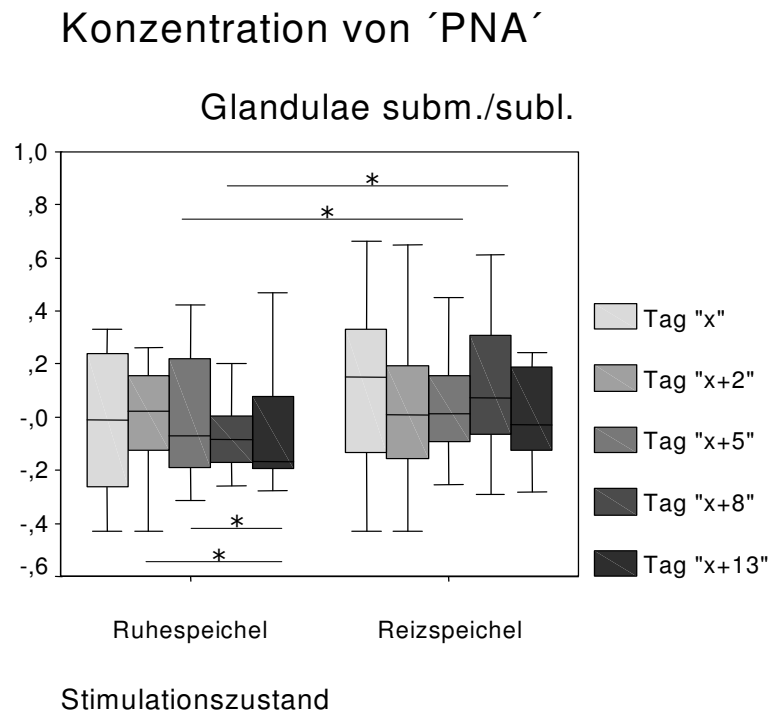


Abbildung 17: vergleichende Darstellung der Konzentrationen der Glandulae submandibulares /-linguales von Peanut Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

5.3.1.2 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'GS1'

Die Glykankonzentrationswerte des gewonnenen Speichels spezifisch in ihrer Adhärenz für das Lektin 'GS1' haben sich bedingt signifikant gezeigt. Auffällig ist eine Konzentrationszunahme der Glandulae submandibulares/ -linguales-Werte im stimulierten Zustand beim Vergleich des Tages „x+2“ mit Tag „x+8“. An den Tagen „x+8“ und „x+13“ nimmt durch die Stimulation die Konzentration signifikant zu.

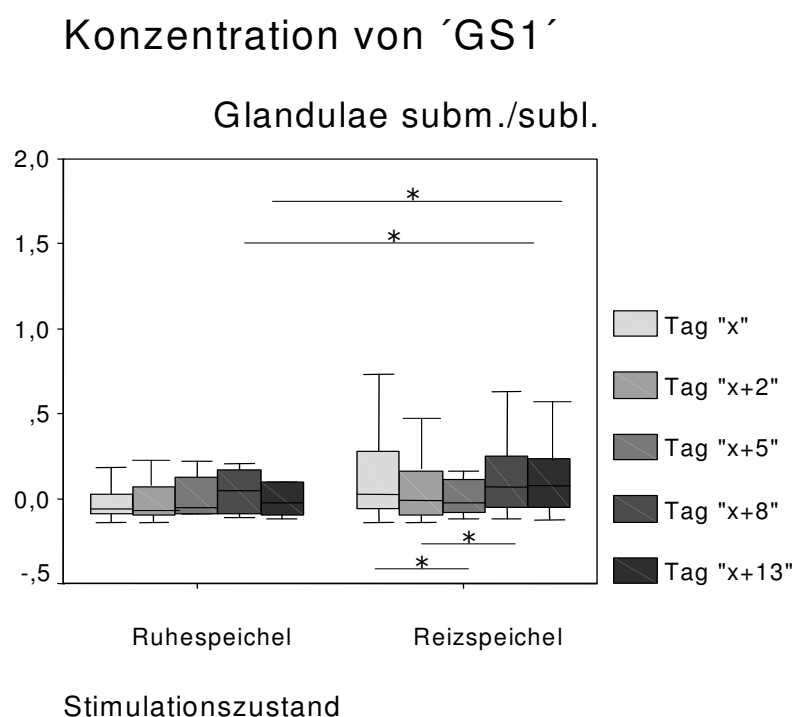


Abbildung 18: vergleichende Darstellung der Konzentrationen der Glandulae submandibulares /-linguales von *Bandeira simplicifolia* Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe; Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

5.3.1.3 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'VVA'

Die labortechnischen Untersuchungen mit dem *Vicia villosa* Agglutinin haben keinen signifikanten Hinweis auf das Verhalten der an das Lektin bindenden Speichelglykanstrukturen im Versuchsverlauf ergeben. Graphiken und Tabellen sind aus diesem Grund in die Arbeit nicht eingeflochten.

5.3.1.4 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'SNA'

Ausschließlich bei separater Betrachtung des Speichels der Drüsen traten Auffälligkeiten in Bezug auf das Lektin 'SNA' zu Tage. Die Glandulae submandibulares /-linguales wiesen im Reizspeichel einen Anstieg der Konzentration der 'SNA'-Rezeptoren von Tag „x+2“ zu Tag „x+13“ auf, sowie auch die Stimulation für den Tag „x+8“ einen signifikanten Konzentrationsanstieg bewirkte.

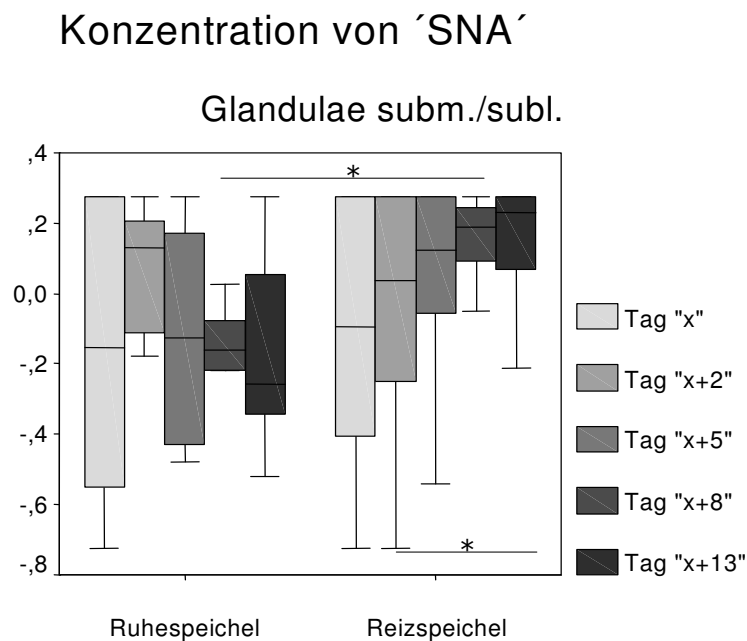


Abbildung 19: vergleichende Darstellung der Konzentrationen der Glandulae submandibulares /-linguales von Sambucus nigra Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe; Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

5.3.1.5 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'AAA'

Die Speicheluntersuchung bezüglich der *Anguilla anguilla* Agglutinin-spezifischen Glykankonzentrationen und des Verhaltens von 'AAA'-Äquivalenten ergab weder im Pool des kalkulatorischen Gesamtspeichels noch bei den einzelnen Drüsen signifikante Ergebnisse.

5.3.2 Betrachtung der Sekretionsraten

Die Sekretionsratenbestimmung im Rahmen der Lektin-spezifischen Speichelanalyse ergab bezüglich der Seiten rechts/ links weder nach separater Betrachtung der Drüsen noch unter Miteinbeziehung der Stimulationszustände signifikante Ergebnisse. Aufschlussreiche Werte wurden hingegen für das Verhalten des kalkulatorischen Gesamtspeichels, der Glandula parotidea sowie der Glandulae submandibulares /-linguales ggf. entsprechend vor und nach Stimulation im Verlauf der Versuchsreihe gewonnen.

5.3.2.1 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'PNA'

Für die Glykokonjugate spezifisch für das Peanut Agglutinin ergaben sich nach strukturierter Aufschlüsselung des Speichels signifikante Werte in Bezug auf die Glandulae submandibulares /-linguales. Die Sekretionsrate zeigte unter Ruhebedingungen einen signifikanten Anstieg von Tag „x+8“ zu Tag „x+13“, und auch der eingesetzte Stimulus bedingte jeweils eine signifikante Konzentrationswertzunahme in Abhängigkeit der Speichelsekretion an den Versuchstagen „x+2“, „x+5“, „x+8“ und „x+13“.

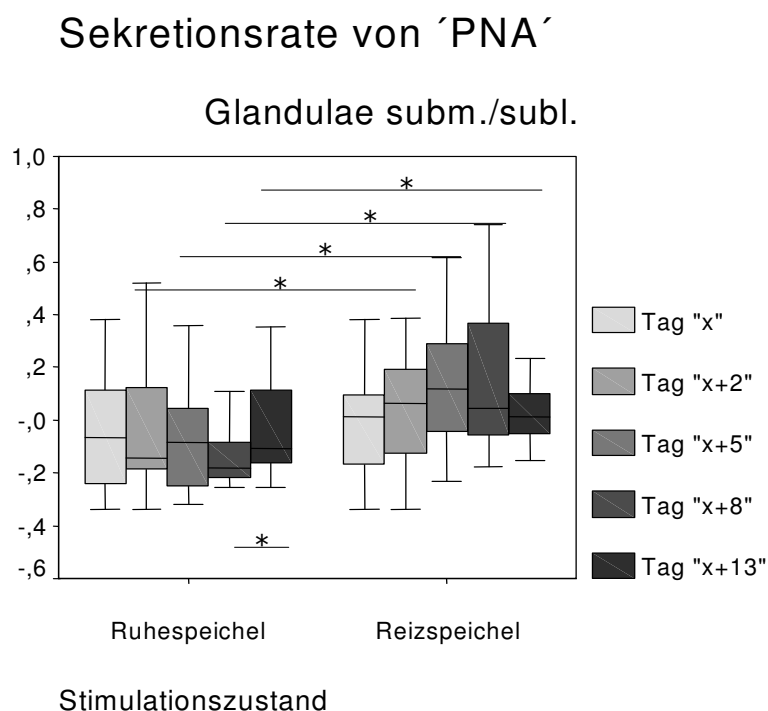


Abbildung 20: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten der Glandulae submandibulares /-linguales von Peanut Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

5.3.2.2 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'GS1'

Die Sekretionsratenwerte unter Betrachtung des *Bandeira simplicifolia* Agglutinins erbrachten ausschließlich im stimulierten Speichel für die Glandulae submandibulares /-linguales signifikante Werte. Es errechnete sich ein signifikanter Abfall von Tag „x+8“ zu Tag „x+13“. Die Stimulation mittels Zitronensäure erbrachte einen signifikanten Sekretionsratenanstieg an den Tagen „x“, „x+8“ und „x+13“.

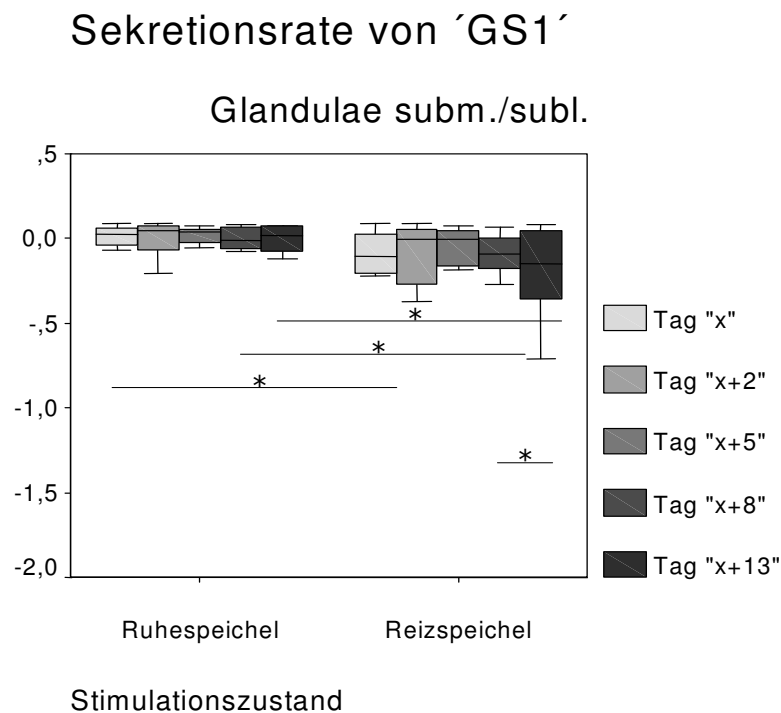


Abbildung 21: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten der Glandulae submandibulares /-linguales von *Bandeira simplicifolia* Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe; Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

5.3.2.3 inhibitorischen Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'VVA'

Wie auch bei den Konzentrationen hat die labortechnische Untersuchung mit dem *Vicia villosa* Agglutinin keinen signifikanten Hinweis auf das Sekretionsverhalten der entsprechenden Speichelglykanstrukturen im Versuchsverlauf gegeben.

5.3.2.4 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'SNA'

Bei detaillierter Betrachtung der 'SNA'-spezifischen Glykanstrukturen im Speichelsekret zeigten nur die Glandulae submandibulares /-linguales signifikante Sekretionsraten. Im Ruhespeichel zeichnete sich eine Augmentation von Tag „x+5“ zu Tag „x+13“ ab sowie im Reizspeichel von Tag „x+2“ zu Tag „x+13“. Die Applikation von Zitronensäure auf die Zunge rief einen signifikanten Sekretionsratenanstieg an den Tagen „x+5“ und „x+13“ hervor. Obgleich die Glandula parotidea keine signifikanten Werte im Versuchsverlauf aufwies, so zeichneten sich jedoch signifikante Anstiege vor und nach erfolgter Stimulation für die Tage „x+5“, „x+8“ und „x+13“ ab.

Eine aussagekräftige Betrachtung mangels Werten war für den unstimulierten kalkulatorischen Gesamtspeichel nicht möglich, jedoch ergaben die Sekretionsraten des Reizspeichels jeweils einen signifikanten Anstieg von Tag „x“, „x+2“ und „x+5“ zu Tag „x+13“.

Sekretionsrate von 'SNA'

Glandulae subm./subl.

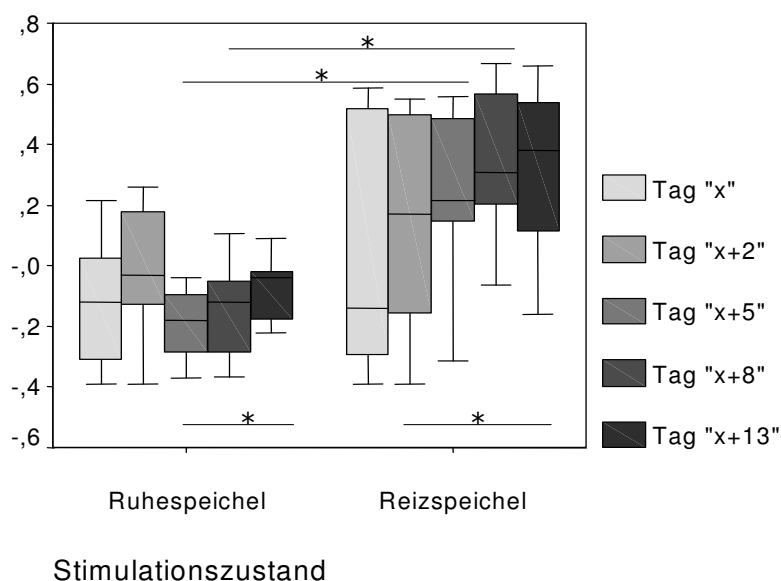


Abbildung 22: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten der Glandulae submandibulares /-linguales von Sambucus nigra Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe; Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

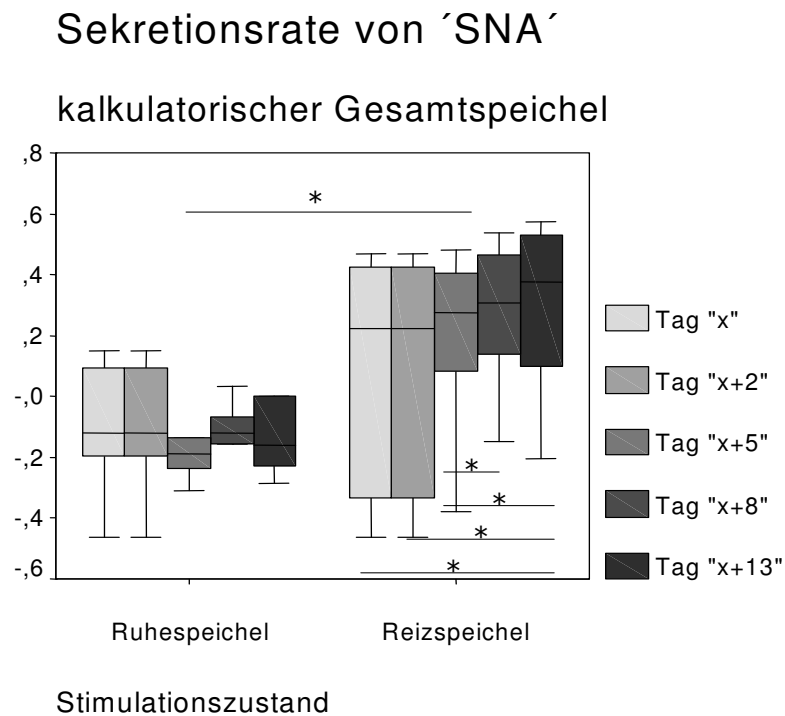


Abbildung 23: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten des kalkulatorischen Gesamtspeichels von 'SNA' im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe;

Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

5.3.2.5 inhibitorische Glykanstrukturen gegenüber Lektin 'AAA'

Bei Betrachtung des kalkulatorischen Gesamtspeichels in Bezug auf 'AAA'-äquivalente Strukturen zeigten sich signifikante Sekretionsraten vor und nach Stimulation. Im Ruhespeichel zeichnete sich ein Anstieg von Tag „x+5“ und „x+8“ zu Tag „x+13“, im Reizspeichel von Tag „x+8“ zu Tag „x+13“ ab. Im direkten Vergleich vor und nach Reizung der Speichelsekretion mittels Zitronensäure zeigte Tag „x+13“ eine signifikante Sekretionsratenzunahme.

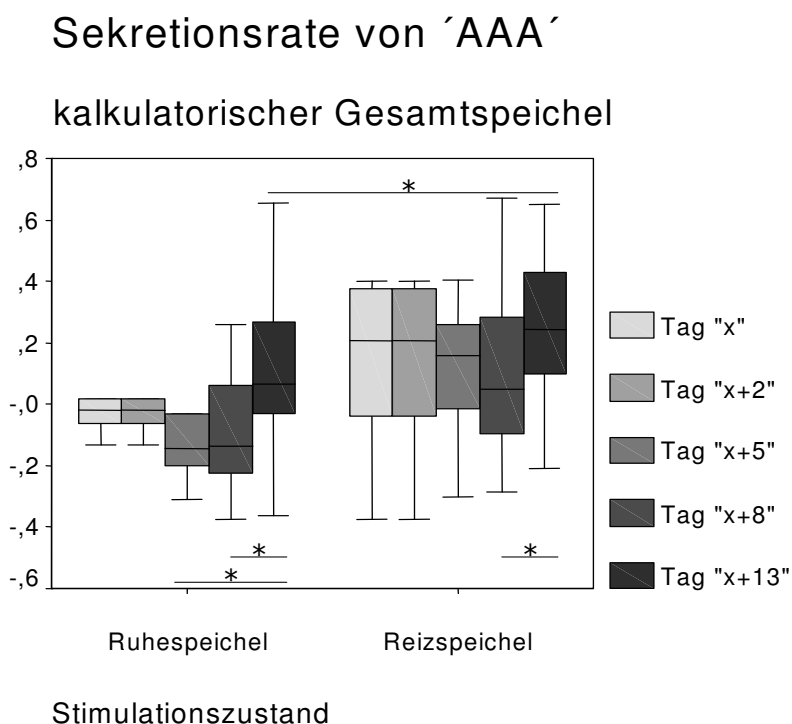


Abbildung 24: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten des kalkulatorischen Gesamtspeichels von *Anguilla anguilla* Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe;
Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

Die Glandula parotidea präsentierte im Reizspeichel eine signifikante Sekretionsratenzunahme von Tag „x+5“ und „x+8“ zu Tag „x+13“, dem die Glandulae submandibulares /-linguales beim Vergleich gleicher Tage im unstimulierten Zustand entsprachen. Zuzüglich wurden Signifikanzen vor und nach Stimulation für die Glandula parotidea an den Tagen „x“, „x+5“, „x+8“ und „x+13“ sowie für die Glandulae submandibulares /-linguales am Tag „x+2“ und „x+8“ deutlich.

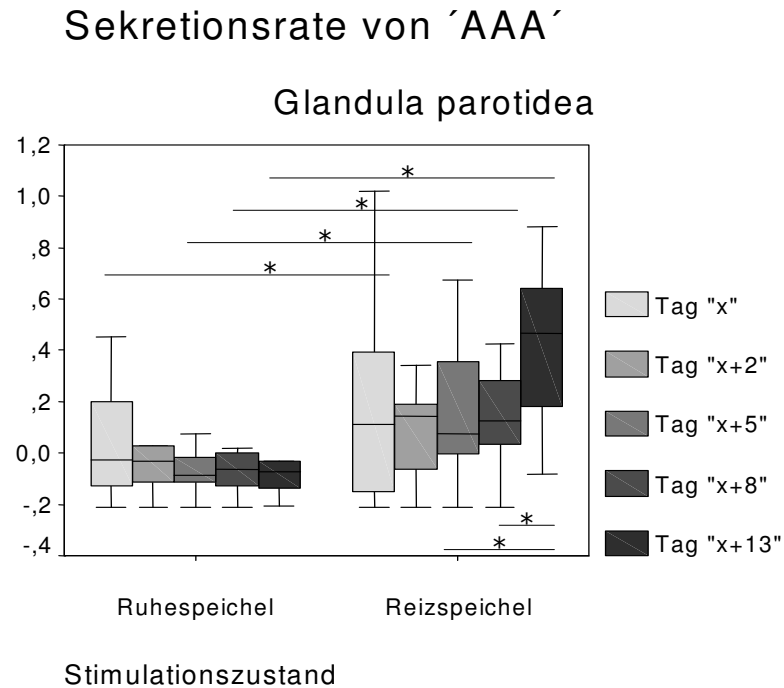


Abbildung 25: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten der Glandula parotidea von *Anguilla anguilla* Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe; Signifikanzen: siehe unten

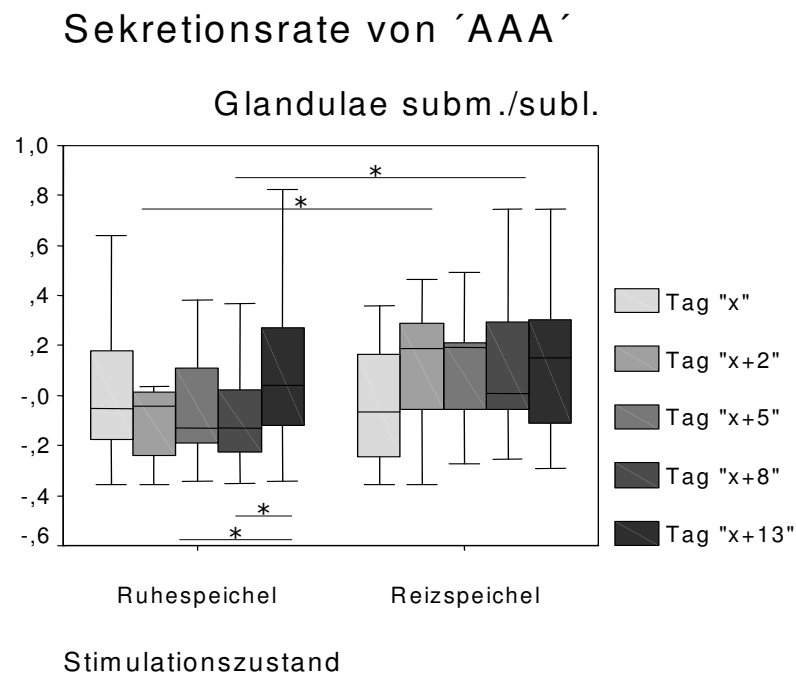


Abbildung 26: vergleichende Darstellung der Sekretionsraten der Glandulae submandibulares /-linguales von *Anguilla anguilla* Agglutinin im unstimulierten und stimulierten Zustand im Verlauf der Versuchsreihe; Signifikanzen: $p < 0,05 \Rightarrow *$, $p < 0,01 \Rightarrow **$, $p < 0,001 \Rightarrow *$**

Lesehinweis:

Unterstrichene Worte innerhalb des Diskussionsteils geben inhaltliche Schwerpunkte einzelner Absätze wieder.

6 Diskussion

Die Menge pathogener Keime im Mundraum ist entscheidend von äußeren Eingriffen in Form von Zahnpflegemaßnahmen abhängig. Wird die Mundhygiene unterlassen, erhöht sich die orale bakterielle Belastung, der Körper reagiert mit einer Gingivitis (Löe 1965) und das Risiko der Ausbreitung der Infektionskrankheiten Karies und Parodontitis steigt (König 2000). Der Mundraum ist für Bakterien als Lebensraum prädestiniert. Grund dafür ist das feuchte, nährstoff- und nischenreiche orale Milieu, in welchem der Speichel eine Schlüsselrolle einnimmt (Koop 1990). Die Bakterien besitzen die Fähigkeit dieses Milieu zu nutzen. Sie adhären mittels ihrer spezifischen Lektine - kohlenhydratbindende Proteine oder Glykoproteine nicht-immunologischer Herkunft - an orale Oberflächen und bilden durch das interbakterielle Zusammenleben einen schützenden Biofilm. Der menschliche Körper wehrt sich mit Hilfe von 'host-defence-Faktoren' gegen die bakteriellen Angriffe und beeinflusst somit das Ausmaß der bakteriell induzierten Erkrankung. Körpereigene Produkte, die der Protektion und Abwehr dienen, werden mittels des Sulkusfluids (Cimasoni 1983) und vor allem des Speichels (Whelton 1996) in die Mundhöhle transportiert. Bei pathologischer Reduktion oder dem Erlöschen der Speichelproduktion, z.B. auf Grund einer Bestrahlungstherapie (Anderson et al. 1981, Ballagh et al. 1994, Someya et al. 2003), gerät das 'host-defence-System' aus dem Gleichgewicht. Die speichelvermittelte Adhäsion und Antiadhäsion nimmt ab, was z.B. das rein mechanische Wegschwemmen der Bakterien durch das orale Sekret reduziert (Kayser et al. 2001). Entzündung und Karies haben es unter diesen Bedingungen wesentlich leichter, sich im Mundraum zu manifestieren.

Zu den oralen Abwehrmechanismen zählen unspezifische antibakterielle Schutzfaktoren und dort im Besonderen Speichelmuzine (König 2000). Diese Glykane werden in den Speicheldrüsen produziert und sind in der Lage, über ihren Glykoproteinanteil die lektinvermittelte Adhäsion der Bakterien an die oralen Oberflächenstrukturen, an das 'Pellicle' oder auch an andere Bakterien kompetitiv zu hemmen (Gibbons & van Houte 1975, Tabak et al. 1982, Levine et al. 1985). Kage et al. stellten die Vermutung auf, dass sich hinter dieser frühzeitigen antibakteriellen Abwehr des Körpers ein Mechanismus benannt als 'first line of defence' verbirgt (Kage et al. 1995). Die Glykananzahl und -zusammensetzung unterliegt genauso wie die Speichelmenge sowohl genetisch determinierten, endogenen als auch exogenen Einflüssen. Die Oligosaccharidstruktur des Glykokonjugats wird in ihrer Synthese im Rahmen des 'processing' über die Aktivierung spezifischer Glykosyltransferasen und Glykosidasen reguliert (Stryer et al. 2003). Ubiquitäre Enzyme, wie z.B. für die N-Glykosylierung, kommen im Wechsel mit individuell exprimierten, beispielsweise wie im Rahmen der O-Glykosylierung bei Blutgruppenantigenen, zum Einsatz. Eine große

Variationsbreite beim biologischen Zusammenbau der Gesamtstruktur ergibt sich durch das Ausgangssubstrat und durch die Vielzahl der Monosaccharide sowie der Enzyme als Angriffspunkte während der Synthese. Die Beeinflussung durch exogene Faktoren haben viele Studien untersucht: Beispielsweise zeigte sich, dass die Gabe von β -adrenergen Rezeptorenblockern über längere Zeit eine Reduktion der Gesamtproteinkonzentration im Speichel bewirkt haben (Ryberg et al. 1989) sowie Glukokortikoide das Glykosylierungsmuster des Speichels durch Sialyltransferaseaktivität verändern (Biol et al. 1991, Coughlan & Breen 1995). Auch der biologische Rhythmus oder Hormone bedingen die Glykanproduktion (Dawes 1996).

Im Bereich des Intestinaltraktes haben Untersuchungen bereits erbracht, dass als externer Reiz das Cholera-Toxin in der Lage ist, auf die Sekretion der dortigen Drüsen über einen intramuralen Reflex einzuwirken (Jodal et al. 1993). Als Übertragung auf das orale System wäre demzufolge eine reflektorische Glykokonjugatproduktion auf einen bakteriellen, so genannten externen Reiz hin denkbar. Um diesen oralen intramuralen Reflex nachzuweisen, müssen die Glykane möglichst in einer natürlichen, konstanten Ausgangsmenge vorliegen und sollten bei ihrer Synthese wenig durch außergewöhnliche Reize stimuliert werden. In dieser Arbeit wurde das Ziel angestrebt, ein allgemeingültiges Bild aufzuzeigen, das durch ein bewusstes Auswahlverfahren möglichst frei von pathologischen Merkmalen, familiären Häufungen und individuellen, prägnanten Habits ist. Diese Arbeit bildet den Versuch, mögliche Zusammenhänge zwischen quantitativen Unterschieden Lektin-spezifischer Speicheldrüsenkomponenten der unterschiedlichen Speicheldrüsensekrete im Verlauf einer zunehmenden bakteriellen Belastung im Mundraum darzustellen. Die Untersuchung wurde nach Art einer experimentell induzierten Gingivitis- bzw. Periodontitisstudie gestaltet, in welcher auf Mundhygiene bewusst für mehrere Tage verzichtet wird. Dieser Methode bedienen sich bereits andere Studien erfolgreich, um z.B. die reaktiven Schleimhautunterschiede zwischen jüngeren und älteren Patienten zu erforschen (van der Velden et al. 1985), das Verhalten von Serumimmunglobulinen und S-IgA einzuordnen (Schencker et al. 1993), natürliche Zähne mit Implantaten bezüglich entstehender Gingivitis und 'peri-implant'-Mucositis zu vergleichen (Pontoriero et al. 1994, Zitzmann et al. 2001), die unterschiedliche Gingivareaktion von Rauchern und Nicht-Rauchern mittels verändertem S-IgA-Gehalt zu erklären (Lie et al. 2002) oder die reaktive Speicheldrüsenkonzentration bezüglich Cystatin zu erkunden (van Gils et al. 2003).

6.1 Auswahl der Probanden

Bei der Auswahl der Probanden wurde versucht, Faktoren, die die Speichelproduktion beeinflussen, zu reduzieren. Hormone und Medikamente können die Sekretionsrate entscheidend verändern. So fand man z.B. unterschiedliche Speichelsekretionsraten von Männern und Frauen (Bergdahl 2000), allgemeine Unterschiede der Speichelzusammensetzung während der Schwangerschaft (Laine et al. 1988), und abweichende Speichel-

sekretionsraten bei Insulin-pflichtigen Diabetikern (Kjellmann 1970). Daher wurde für diese Studie Wert auf eine allgemeinmedizinische Gesundheit gelegt und eine Auswahl ausschließlich männlicher Probanden getroffen, um den Faktor der hormonellen Erkrankungen sowie der monatlichen Hormonschwankungen zu minimieren.

Eine ausgewogene Lebensführung war erwünscht. Dem Konsum von Nikotin, welcher nicht nur die Speichelzusammensetzung, sondern auch die Bakterienflora im Mundraum verändert (Heintze 1984), dem Drogenmissbrauch und einem Alkoholabusus durften die Probanden nicht anhängen (Kintz 2002, Fucci 2003, Friedland 2003, Swift 2003). Obgleich nur wenige Beweise für den Einfluss von verschiedenen diätetischen Ernährungsformen auf die Speichelzusammensetzung vorliegen (Dawes 1970, Johansson & Birkhed 1994; Johansson et al. 1994), mussten die Probanden prophylaktisch eine ausgewogene Ernährungsweise zusichern.

Ebenso wurden lokale Faktoren des Mundraumes, die auf eine primär erhöhte Bakterienzahl hindeuteten, berücksichtigt. Parodontopathien, Mundschleimhauterkrankungen und kariöse Läsionen waren ein Ausschlusskriterium zur Teilnahme an dieser Studie. Alle Probanden zeigten eine gute Mundhygiene. Da die Plaqueakkumulation bei einem vollbezahnten im Vergleich zu einem reduzierten Gebiss unterschiedlich ist, wurde in Anbetracht der später durchzuführenden Hygienestaten der Anspruch an eine Mindestanzahl von 24 Zähnen gestellt. Zudem lassen Untersuchungen vermuten, dass auch die Zahnanzahl einen bedingten Einfluss auf den Stimulationszustand der Drüsen inne hat: ein reduziertes Gebiss weist eine geringere Sekretionsrate auf (Bergdahl 2000).

Differierend zu histologischen Untersuchungen scheint das Lebensalter keinen Einfluss auf eine veränderte Speichelsekretion zu besitzen (Dawes 1996). Bei Ratten stellte man hingegen einen altersabhängigen Unterschied des Glykanmusters fest (Kousvelari et al. 1988). Zur Sicherheit wurde in dieser Studie eine möglichst geringe Altersdifferenz der Probanden angestrebt. Letztendlich ergab sich bei den 22- bis 37-jährigen ein Altersunterschied von 15 Jahren mit einem Meridian von 27,8 Jahren.

Ein genetischer Polymorphismus und der biologische Rhythmus beeinflussen den Speichel in seiner Zusammensetzung und seine Sekretion, ohne dass auf sie eingewirkt werden kann. Diese interindividuelle Diskrepanz muss bei 'in vivo'-Studien akzeptiert und bei der Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden.

6.2 Vorbereitung der Probanden

Die Probanden mussten ein hohes Maß an Initiative und Selbstdisziplin mitbringen, um ein Gelingen der Studie zu ermöglichen. Ein intensives Einführungs- und Aufklärungsgespräch sowie Zeit zur Entscheidungsfällung vor der Einwilligung zur Studiendurchführung stellten notwendige Grundvoraussetzungen dar. Der Studienablauf war übersichtlich strukturiert. Um

circadiane und circannuale Rhythmen, welche erwiesenerweise ebenfalls Einfluss auf die Speichelproduktion, -menge und -flussrate nehmen (Whelton 1996), einzudämmen, sollten alle Probanden in aufeinanderfolgenden Terminen, an gleichen Tagen, jeweils um 18:00 Uhr vorstellig werden. Studien haben gezeigt, dass die Speichelsekretion nachmittags signifikant höher ist als am Morgen (Nederfors & Dahlof 1993). Die Aufnahme der Nahrung und das Trinken von koffein-, teein-, zucker- und säurehaltigen Getränken sollte ab drei Stunden vor Versuchsbeginn unterbleiben, um direkte nutritive Einflüsse auf die Speichelmenge und -sekretion zu minimieren (Dawes 1996). Nach einer allgemeinanamnestischen und oralen Eingangsuntersuchung begann die Studie jeweils an einem Mittwoch, dem so genannten Tag „x“. Nach einer weiteren Kontrolle zwei Tage später, Tag „x+2“, führten die Probanden am Abend des fünften Tages ihre gewohnten Mundhygienemaßnahmen zum vorerst letzten Mal aus. Von der Durchführung einer professionellen Zahnreinigung zu Beginn der Studie bzw. an Tag „x+4“ wurde bewusst abgesehen, da ein unbeeinflusstes, physiologisches, realitätstreuendes Milieu im Mundraum gewünscht wurde, welches mit seiner individuellen Reaktion auf die veränderte Mundhygiene betrachtet werden sollte. Es war nicht beabsichtigt, eine künstliche Vergleichbarkeit aus einem Optimalmilieu heraus zu erzielen. Ab dem sechsten Tag, Tag "x+5", enthielten sich alle Probanden jeglicher Mundhygiene für die folgenden acht Tage. Um gewohnheitsmäßigen Handlungen vorzubeugen, wurden die Freiwilligen gebeten, die häuslichen Zahnbürsten am Kontrolltag "x+5" zur Verwahrung auszuhändigen. Während der Phase der steigenden bakteriellen Belastung auf Grund der Vernachlässigung der Mundhygiene erschienen die Probanden zu drei Untersuchungsterminen. In Anbetracht der angestrebten Beurteilung der Speichelkonzentration und -sekretion in Abhängigkeit zur oralen bakteriellen Entwicklung fiel die Auswahl der Termine auf das Ende des ersten Tages "x+5", da zu diesem Zeitpunkt nach der 'Pellicle'-Bildung die Anlagerung der Bakterien an die Zahnoberflächen eingesetzt hat. Eine weitere Kontrolluntersuchung wurde in der Phase, in der laut Studien gramnegative Bakterien in der Plaque dominieren (Gibbons & van Houte 1975, Socransky et al. 1977, Theilade et al. 1982), ausschließlich am Ende des neunten Tages, Tag "x+8", durchgeführt, um den zeitlichen Aufwand der Freiwilligen zu begrenzen. Den Abschluss bildete der Termin am letzten Tag der Mundhygieneabstinenz, Tag "x+13", an dem die Plaque bereits in die so genannte vierte Phase eingetreten ist und eine komplexe Struktur angenommen hat.

6.3 Validität der Untersuchung

Um eine reflektorische Veränderung der Speichelproduktion auf Grund der steigenden bakteriellen Belastung nachzuweisen, wurden sowohl klinische als auch labortechnische Untersuchungen erhoben. Der klinische Teil beinhaltete nach der Aufnahme des Zahnstatus regelmäßige Kontrollen des Plaquewachstums und des gingivalen Entzündungsgrades. Daran anschließend wurde den Probanden drüsenspezifisch Speichel im unstimulierten und

nachfolgend im stimulierten Zustand abgenommen. Laboruntersuchungen des Speichels dienten der Bestimmung der Speichelmenge und der Sekretionsrate, sowie der Charakterisierung und Quantifizierung der Glykokonjugate.

6.3.1 Validität der klinischen Untersuchung

Zur Sicherung der Validität ermittelte stets der gleiche Behandler den Plaque- und gingivalen Entzündungsstatus an Hand von international anerkannten Indices. Somit wurden interindividuelle Diskrepanzen, die stets bei der Durchführung, z.B. in Form von differierenden Sondierungsintensitäten und Gradeinteilungen auftreten können, innerhalb der Studie weitestgehend ausgeschlossen. Die Ergebnisse gab die gleiche Person direkt am Behandlungsstuhl in einen Computer ein. So konnten Übertragungsfehler durch das Ansagen und Notieren von Befunddaten auf ein Mindestmaß reduziert werden. Die Untersuchungsbedingungen gestalteten sich bezogen auf die instrumentelle Ausstattung optimal. Eine zahnärztliche Einheit mit heller Lichtquelle und einem Luftbläser sowie ein oberflächenverspiegelter Mundspiegel und eine Parodontalsonde dienten der zuverlässigen Befundaufnahme. Die Apparatur zur Speichelabnahme wurde stets an die gleiche zahnärztliche Einheit angeschlossen und die Speichelsauger stets von derselben Person in einer routinemäßig ausgewählten Reihenfolge im Mundraum platziert bzw. aus ihm entfernt. Die Applikation der Zitronensäure auf der Zunge des Probanden erfolgte ebenfalls durch einen Behandler mit konstanter Handhabung. Um sicherzustellen, dass die gesamte gewonnene Speichelmenge aus den Silikonschläuchen der Apparatur in die Auffanggefäße gelangte, wurde nach Ablauf der Speichelabnahmezeit vor dem Ausschalten der zahnärztlichen Einheit eine zweiminütige Leerlaufzeit eingehalten.

6.3.2 Validität der labortechnischen Untersuchung

Die Speichelmenge wurde mit Hilfe einer digitalen, geeichten Waage sogleich nach dem Ende der klinischen Untersuchungen ermittelt. Das standardisierte, gemittelte Leergewicht der Probengefäße wurde an jedem Versuchstag zur Sicherheit kontrolliert und vom Messergebnis subtrahiert.

Nach der Abfüllung des gewonnenen Sekrets in „Greiner“-Röhrchen diente beim Transport der Proben eine Kühlbox angefüllt mit Trockeneis der Minimierung der Einflüsse von Proteasen und Glykohydrolasen aus den Speicheldrüsen. Im Anschluss erfolgte das Einfrieren des Speichels bei – 80 °C bis zur labortechnischen Untersuchung.

Um ein hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit bei den Analysen zu gewährleisten, kamen soweit möglich kommerzielle Reagenzien zum Einsatz. Wenn der Erwerb solcher Reagenzien nicht gegeben war, erfolgte eine eigene Herstellung in ausreichender Menge, um bei allen Versuchen aus derselben Charge arbeiten zu können. Für die Biotinylierung der Lektine war dies notwendig. Es kamen gereinigte, standardisierte kommerziell erhältliche pflanzliche Lektine zum Einsatz, die eine charakteristische Bindungsspezifität besitzen.

In Vorversuchen wurde eine Speichelverdünnung von 1:7,5 ermittelt. Nach Abschluss der durchgeführten labortechnischen Untersuchungen repräsentierte diese Speichelverdünnung wie erwartet gültige Werte und fand demzufolge Verwendung bei der statistischen Auswertung.

Zur Sicherung der Pipettierqualität und Fehlerminimierung bei der Erstellung von Verdünnungsreihen wurden alle Messungen in doppelter Ausführung vollzogen. Wichen die Vergleichswerte um mehr als 25% voneinander ab, wurde dies als ein so genannter Ausreißerwert gedeutet und als 'missing value' in die Auswertung eingerechnet. Zur Kontrolle, ob die beobachteten Messwerte durch eine unspezifische Bindung hervorgerufen wurden, lief parallel auf jeder Mikrotiterplatte die Messung eines Leerwertes mit. In das entsprechende Well wurde anstelle einer Speichelprobe oder eines Standards lediglich Verdünnungspuffer eingebracht. Als Ergebnis zeigten sich ausschließlich schwindend geringe Werte, denen keine Bedeutung zugesprochen werden musste. Ihre Ursache kann in der Existenz unspezifischer Bindungen begründet liegen. Es war nicht möglich alle Messungen zeitlich parallel auszuführen. Um nicht durch Schwankungen den Lektinvergleich zu beeinflussen, wurden alle Proben von zwei Probanden bezogen auf alle Lektine stets gemeinsam gemessen. Auf einer Mikrotiterplatte fanden die Ruhe- oder Reizspeichelproben eines Probanden aller Untersuchungstage Platz, die jeweils mit einem Lektin beschickt wurden. Somit war die Ermittlung einer möglichst genauen Veränderung der Lektinbindungskapazität gewährleistet.

6.4 Methodik der klinischen Untersuchungsparameter

Zur Bestimmung des Plaquewachstums und des gingivalen Entzündungsgrades stehen eine Reihe von Methoden zur Auswahl. Die Plaque kann z.B. nach ihrer Lokalität, ihrer Dicke, ihrer Schichtung, ihrem Alter und ihrem prozentualen Anteil bezogen auf die vorhandenen Zähne beurteilt werden. Bezüglich der gingivalen Entzündung gibt das Erscheinungsbild der Gingiva in Farbe, Form und Blutungsneigung oder das Sulkusfluid mit seiner Fließrate eine Orientierung.

Um das Plaquewachstum im Versuchsverlauf zu dokumentieren, wurde ein modifizierter Index nach QUIGLEY & HEIN (= QH) ausgewählt (Quigley & Hein 1962). Er bietet mit seiner Einteilung in sechs Grade die Möglichkeit einer sehr detaillierten Differenzierung der flächenhaften Plaqueverteilung. Es wurden vier Zähne pro Quadrant, welche vor Studienbeginn als bei allen Probanden vorhanden und somit identisch eruiert wurden, im Studienverlauf kontrolliert. Die variable Betrachtung von lingualen Zahnflächen im zweiten und vierten Quadranten sowie vestibulären im ersten und dritten ergab einen generellen Überblick über die orale Situation. Als Modifikation des Tests zeigte sich eine Handhabung bezüglich der Durchführung innerhalb dieser Studie als unumgänglich: Zur Bewertung der Plaquemenge wurde auf das Anfärben mit einem Plaquerevelator verzichtet, da eine darauffolgend notwendige Entfernung der Farbzonen mit dem Versuchsziel nicht zu vereinbaren war. Diese Änderung brachte aber unter Zuhilfenahme des zahnärztlichen Luftbläses durch temporäre Trocknung und bessere Visualisierung der Zahnglattflächen keine Probleme bezüglich der

Plaque-Klassifizierung im Sinne des QH mit sich.

Ergänzend wurde für die Ermittlung der gingivalen Entzündungsneigung der Papillen-Blutungs-Index (= PBI) nach MÜHLEMANN & SON ausgewählt (Mühlemann & Son 1971). An den Zähnen, an denen die QH-Messungen durchgeführt wurden, erfolgte auf der entgegengesetzten vestibulären oder lingualen Seite des Zahnes unter Einbeziehung der mesialen Zahnfleischpapille das Sondieren des gingivalen Sulkus. Somit lag unabhängig von der Zahnzahl des einzelnen Probanden eine einheitliche Zahl von Messwerten vor. Aus der Blutungsstärke ergab sich jeweils ein Wert zwischen 0 und 4, welcher entsprechend addiert und durch die untersuchte Zahnanzahl dividiert in der statistischen Auswertung der Einordnung des im Mundraum vorliegenden Entzündungsgrades diente. Studien belegen, dass gingivale Entzündungen durch das leichte Provozieren von Blutungen mittels dentaler Sonden mit einer höheren Zuverlässigkeit nachgewiesen werden können, als durch rein visuell beobachtete Entzündungszeichen (Greenstein et al. 1981).

Für die Kombination der Anwendung dieser Indices sprach eindeutig die mögliche Beurteilung der buccalen und lingualen Glattflächen der Zähne durch den QH sowie die nachvollziehbaren Rückschlüsse auf die Interdentalräume, die sich aus den Messungen des PBI ergeben. Beide korrelieren mit der ansteigenden Bakterienanzahl im Mundraum und stellen einen statistisch verwertbaren, absoluten Zahlenwert nach Aufsummierung der beobachteten Einzelwerte pro Zahn und Division durch die betrachtete Zahnanzahl dar.

6.5 Methodik der Speicheluntersuchung

6.5.1 Methodik der Speichelgewinnung

Speichel kann auf verschiedenste Weisen dem Mundraum entnommen werden. Um eine detailliertere Aussage über die Glykankonzentrationen sowie über die Potenz der großen Speicheldrüsen hinsichtlich ihrer Möglichkeiten, Glykokonjugate bereitzustellen, machen zu können, ist das Sammeln von drüsenspezifischen Speichelproben erforderlich. Der auf diese Weise gewonnene Speichel bleibt von Inhaltstoffen des Mundmilieus, d.h. z.B. Enzymen anderer Herkunft, Bakterien und deren Zerfallsprodukten, weitgehend unbeeinflusst. Für die drüsenspezifische Entnahme kommen relativ aufwendige, spezielle Apparaturen zur Anwendung. Die Gewinnung von reinem Parotis-Sekret konnte schon 1910 von CARLSON & CRITTENDEN mit Hilfe eines speziell entwickelten Geräts verwirklicht werden (Carlson & Crittenden 1910). Eine ähnliche, 1916 von LASHLEY beschriebene Apparatur ist mit geringen Modifikationen noch heute gebräuchlich (Lashley 1916). Der Kollektor besteht aus zwei konzentrischen Hohlräumen in einer flachen Metall- oder Kunststoffschale. Der innere Hohlraum ist über einen Schlauch mit dem Sammelbehälter verbunden und wird auf das Ostium des Stenon' Ganges platziert. Der äußere Hohlraum hält mittels applizierten Unterdrucks den Kollektor an der Wangenschleimhaut fest. Die Gewinnung des Submandibularis- /Sublingualis-

Sekrets bereitet auf Grund der anatomischen Gegebenheiten größere Probleme. 1955 wurde von SCHNEYER eine Weiterentwicklung des 'Segregators' von PICKERRILL vorgestellt, die es ermöglichen sollte, die Sekrete der Glandula submandibularis und der Glandula sublingualis getrennt aufzunehmen (Schneyer 1955; Pickerill 1919). Der Kollektor musste für jeden Probanden individuell angefertigt werden, um der anatomischen Schwankungsbreite Rechnung zu tragen. Dass es durch Unterteilung der Kammern tatsächlich gelang, die Sekrete der beiden Drüsen zu trennen, darf allerdings bezweifelt werden. Individuelle anatomische Verhältnisse sorgen teilweise schon vor Austritt der Sekrete in die Mundhöhle für eine Mischung, und die Ostien der Ducti liegen häufig sehr dicht beieinander (Rohen 1997). SCHNEYERS Apparatur wurde häufig zur Grundlage von Weiterentwicklungen genutzt, die einen besseren Halt im Mundboden (Wolf 1964), eine universelle Einsatzfähigkeit des Kollektors bei einer größeren Probandenzahl (Truelove 1967) oder eine Reduzierung der Störanfälligkeit durch Schluckbewegungen (Stephen 1978) zum Ziel hatten. Seit 1986 ist eine kommerziell hergestellte Anlage für die Gewinnung von Mundbodensekreten erhältlich, die durch bewegliche Teile den individuellen anatomischen Verhältnissen angepasst werden kann (Coudert et al. 1986). Aber trotz allem wird stetig an Weiterentwicklungen gearbeitet, um vor allem die Praktikabilität, die Effektivität und den Komfort für den Patienten zu optimieren (Wolff et al. 1997). Von einer Trennung des Sekrets der Glandula submandibularis von dem der Glandula sublingualis ist jedoch nicht mehr die Rede.

In dieser Studie kam eine im Rahmen einer Dissertation im Zentrum für Zahnmedizin, Campus Virchow-Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin, speziell angefertigte Apparatur zum Einsatz (siehe 4.2.2.2; Jancke 2002), die durch ihre Flexibilität und individuelle Einsetzbarkeit die akkurate, separate Entnahme von Speichel der Glandula parotidea und der Glandulae submandibulares /-linguales ermöglichte. Eine unkomplizierte und einfache Handhabung bedingte eine rasche und trotz allem präzise Positionierung der Sauger im Mundraum, die von den Probanden als nicht unangenehm beurteilt wurde. Weder ein Auslösen des Brechreizes noch Probleme bei der Atmung traten auf. Während der Entnahme des Speichels war zu beobachten, dass der Zungenrand und der Mundboden von einem zähen, mukösen Film überzogen blieben. Es bildeten sich jedoch keine Speichelansammlungen im Mundboden aus, und das Frenulum labiale zeigte sich in einem trockenen Zustand. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Speichel aus den großen Drüsen des Mundbodens vollständig abgesaugt wurde und keine Mischung von links und rechts stattfand. In Bezug auf den Parotis-Speichel konnte ein blasenfreier Entnahmeprozess beobachtet werden, und die Wangenschleimhaut deutete auf einen vollständigen Kollektionserfolg hin. Der sich abzeichnende muköse Film auf der Schleimhaut war ein Indiz für das Sekret der kleinen Mundschleimhautdrüsen, welches in dieser Untersuchung nicht aufgefangen wurde. Praktisch ist es sehr schwierig, eine repräsentative Menge an Speichel der kleinen Drüsen auf Grund ihrer individuellen Ausführungsgänge und ihrer unregelmäßigen Verteilung innerhalb der Mukosa zu sammeln (Söderling 1989). Jedoch liegen mittlerweile Studien vor, welche belegen,

dass mit Hilfe neu entwickelter Apparaturen eine für chemisch analytische Zwecke ausreichende Menge an Speichel der Glandulae minores gesammelt werden kann (Boros et al. 1999).

Neben der grundsätzlichen Separation des Speichels nach seiner drüsenspezifischen Herkunft wurde zusätzlich die Gewinnung von Ruhe- und Reizspeichel unterschieden. Die Menge der zur Verfügung stehenden antiadhäsiv wirkenden Speichelparameter wurde während der Ruhephase ermittelt. Nachfolgend sollte die Potenz der Drüsen zur Stimulation und kurzfristigen Bereitstellung auf Grund eines aktiven äußeren Einflusses betrachtet werden. Um einen kontrollierten, systematisierten, direkten Vergleich über die Menge an Speichelglykokonjugaten der verschiedenen Speicheldrüsen während der Ruhe- und Reizphase zu erhalten, wurde in der vorliegenden Studie Speichel vor und nach gustatorischer Stimulation mit 2%iger Zitronensäure über eine zeitliche Periode von jeweils 20 Minuten entnommen. Bei einer reinen Steigerung der Flüssigkeitssekretion ist grundsätzlich eine Verdünnung der Konzentrationswerte der Glykane des Ruhespeichels im Reizspeichel zu erwarten (Grönblad 1982).

6.5.1.1 *Ruhespeichel*

Die Abnahme von unstimuliertem Speichel stellt sich genau genommen als unmöglich dar, da der Speichelfluss stets irgendeiner Art von Stimulation unterliegt (Kerr 1961).

Zur Gewinnung des so genannten unstimulierten Speichels existieren im Wesentlichen vier Methoden (Kerr 1961; Navazesh 1993):

- 'draining method': Überschüssiger Speichel rinnt bei leicht nach vorn geneigtem Kopf des Probanden über dessen leicht geöffnete Unterlippe in ein Sammelgefäß.
- 'spitting method': Einmal pro Minute wird der sich im Mundboden ansammelnde Speichel in ein Sammelgefäß gespuckt.
- 'suction method': Mittels verschiedenster Apparaturen wird der Speichel durch periodisches Saugen aus dem Ausführungsgängen der Glandulae majores in ein Sammelgefäß geleitet.
- 'swab absorbent method': Die Speichelaufnahme erfolgt durch in den Mund eingebrachte Wattepellets oder -rollen, die anschließend zur Speichelmengenbestimmung gewogen bzw. zentrifugiert werden.

KERR erwähnte in seinen Untersuchungen nochmals explizit, dass der bei den verschiedenen Methoden im Munde zurückbleibende Restspeichel jeweils unterschiedlich groß ist (Kerr 1961). In dieser Studie kam auf Grund der Verwendung der beschriebenen Apparatur zum Aufsammeln des Speichels die so genannte 'suction method' zum Einsatz. Alle anderen Techniken der Speichelkollektion bieten nicht die Möglichkeit der Protektion vor oralen Bakterien und ihren Einflüssen auf die Speichelkomponenten sowie die Option der akkuraten Trennung der verschiedenen Drüsensekrete.

Zur optimalen Gewinnung des Ruhespeichels wurden die Probanden angewiesen, drei Stunden

vor Kontrollbeginn keine Nahrung mehr zu sich zu nehmen. Auf diese Weise wurde versucht, sowohl die Speichelproduktion als auch den Flüssigkeitshaushalt auf ein möglichst vergleichbares Maß einzustellen. Bei der Speichelentnahme selbst wurden die Freiwilligen angehalten, eine entspannte Körperhaltung im Stuhl der zahnärztlichen Einheit einzunehmen und sich aller Mund- sowie Körperbewegungen zu enthalten. Zusätzliche Stimuli sollten auf ein Mindestmaß reduziert werden, so dass sich neben der cholinergen Stimulation durch die oral platzierte Apparatur ein möglichst physiologischer Ruhespeichel ergeben konnte. Um für eine Untersuchung eine mengenmäßig ausreichende Anzahl von Proben zu gewinnen, ist es notwendig, den Speichel über mindestens 15 Minuten zu sammeln (Dawes 1969). Zur Sicherstellung der für die labortechnischen Messungen notwendigen Speichelmengen wurde die Versuchsreihe auf eine 20minütige Abnahmezeit ausgelegt. Des Weiteren bestand bei diesem vergleichsweise langen Zeitraum zu einem hohen Maß die Gewähr, dass sich die Stimulation in der Speichelzusammensetzung niederschlagen würde. Es entstanden für die jeweiligen Speicheldrüsen in der Mehrzahl relativ umfangreiche Proben von mehreren Millilitern.

6.5.1.2 *Reizspeichel*

Im Rahmen einer nicht-invasiven Stimulation des Speichelflusses können die mastikatorische und die gustatorische Methode eingesetzt werden und kommen auch zu einem sehr hohen Prozentsatz in Studien zur Anwendung (Navazesh 1993).

Beim erst genannten mastikatorischen Verfahren kaut der Proband auf einem standardisierten Stück Paraffin. Nach zweiminütigen Kaubewegungen wird der Mund von Speichel entleert, um danach unter fortgesetztem Kauen und zwischenzeitlichem Ausspucken über eine definierte Zeitspanne eine rein stimulierte Speichelmenge sammeln zu können. Diese Methode bot sich für die Untersuchungsreihe einerseits auf Grund der sich im Mund befindenden Sauger an den Drüsenausführungsgängen nicht an, und andererseits war im Versuchsaufbau auch das Anlegen an die Probanden gestellt, ab dem Tag „x+5“ sich unter anderem des Kaugummi-Kauens zu enthalten. Der provozierte Abrieb der gewünschten Plaque sollte vermieden werden. Dieser Anspruch war demzufolge auch für die Art der Speichelstimulation zu stellen.

Die gustatorische Methode bedient sich einer 1-6%igen Zitronensäure, die in standardisierter Menge in festen Intervallen auf die Zunge getropft wird. Neben Salz kann ebenfalls Zucker als variierender Stimulus zur Anwendung gebracht werden. Tierstudien haben gezeigt, dass bei habitueller unilateraler Mastikation die Speichelsekretion der Drüse der beanspruchten Seite höher ist als die der Bolus fernen (Anderson et al. 1985). Auch Humanstudien haben dies zumindest bezogen auf die Glandula parotidea bestätigt (Losso et al. 1997). Um diesen Sachverhalt der einseitig erhöhten Stimulation der Drüsen zu vermeiden, ist bei drüsenspezifischer Speichelabnahme die zentral auf die Zungenmitte applizierbare Zitronensäure zu präferieren. Die leichte Handhabung und die Effektivität bedingten zusätzlich die Entscheidung, in dieser Studie eine 2%ige Zitronensäurelösung zur Erzeugung des Reizspeichels zu verwenden. Außerdem handelt es sich bei dieser Art der Flussratenerhöhung

um die häufigste Anwendung in Studien (Duran et al. 1998), so dass eine gute Vergleichbarkeit mit anderen Veröffentlichungen resultiert. Die „standardisierte Menge“ der applizierten Zitronensäure differiert jedoch trotz allem von Studie zu Studie. Auch wurde in dieser Studie z.B. die Zungenmitte zu Beginn des 20minütigen Abnahmeintervalls einmalig mit einer stets gleichen Menge Zitronensäure beschickt, hingegen z.B. TENOVUO für die „gustatorische Methode“ eine regelmäßige Applikation einer bestimmten Menge von Zitronensäure alle 30 oder 60 Sekunden angibt (Tenovuo 1989). Des Weiteren besteht bei dieser Stimulationsmethode - handelt es sich nicht um drüsenspezifisch aufgefangenen Speichel wie in dieser Untersuchung - eine Versetzung der gewonnenen Speichelprobe mit Zitronensäure. Dies kann beispielsweise bei der Bestimmung der Pufferkapazität von Bedeutung sein und ggf. eine unkontrollierte Veränderung von Speichelkomponenten bedingen (Navazesh 1993).

Weitere Ursachen, die einen erhöhten Speichelfluss zur Folge haben, gelang es so gut wie möglich zu minimieren. Die Zitronensäure wurde bei Raumtemperatur gelagert, um einen unkontrollierbaren und schwer vergleichbaren Kältestimulus auszuschließen (Dawes et al. 2000). Ein olfaktorischer Reiz wurde vermieden; auch ein Würgereiz bzw. gar ein Erbrechen traten bei keinem Probanden in Erscheinung. Es ist bekannt, dass eine gesteigerte Kauaktivität zu einer Vergrößerung der Speicheldrüse führt (Johnson & Sreebny 1982). Individuelle Größenunterschiede der Drüsen konnten in dieser Studie keine objektive Betrachtung finden, nur eine möglichst gleichwertige Ernährungsform der Probanden, d.h. z.B. der Ausschluss eines reinen Rohkostkonsums, wurde angestrebt.

Folglich war es in dieser Studie auch nicht möglich, die tatsächlichen Sekretionsleistungen des Drüsengewebes zu ermitteln, da hierfür die sezernierte Menge pro Zeiteinheit in Relation zum Drüsengewicht gesetzt werden müsste (Dawes 1996). Bei ´in vivo´-Untersuchungen humaner Speicheldrüsen kann auf letzt genannte Größe nicht zurückgegriffen werden. Als wichtig für die Beurteilung der Belastbarkeit und der Leistungsfähigkeit der einzelnen Drüsen hat sich in Abhängigkeit der produzierten Speichelmenge die Berechnung der Sekretionsrate erwiesen. Diese ergibt sich aus der sezernierten Menge (in ml) bezogen auf die Zeit (in min) und ist demzufolge in der vorliegenden Studie entsprechend der Glandula parotidea und den Glandulae submandibulares /-linguales rechts sowie links im unstimulierten und stimulierten Zustand über einen Zeitraum von 20 Minuten errechnet worden. Schwankungen der Sekretion innerhalb der 20minütigen Abnahmeperiode sind auf diese Weise nicht beurteilbar.

6.5.2 Methodik der Bestimmung der Glykanstrukturen

Die Analysierung von Glykanstrukturen kann grundsätzlich unter der Betrachtung physiko-chemischer oder funktioneller Gesichtspunkte erfolgen.

Die physiko-chemische Analytik bietet mit Hilfe der hochauflösenden NMR- (= ´nuclear magnetic resonance´) Spektroskopie (Dua et al. 1986, Montreuil 1984) und der MALDI-TOF- (= ´matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight´) Massenspektroskopie (Kimura et al. 1996, Melo et al. 1997, Sato et al. 1998) bzw. einer Kombination verschiedener

Verfahren, wie z.B. der enzymatischen Degradation, die Möglichkeit, ab einer bestimmten Menge des zu identifizierenden Glykans seine Struktur sehr detailliert aufzuklären. Nachteilig stellt sich jedoch die im Labor sehr aufwendige Separierung und Isolierung der Glykane von den Glykokonjugaten dar. Des Weiteren lassen sich aus heterogenen Proben nicht alle Glykane bestimmen, und direkte Aussagen über die Funktion, die Syntheseprozesse sowie die Bindung an ein Lektin sind nicht ableitbar.

Mittels der funktionellen Analyse können die Biosynthese und der Metabolismus von Glykanstrukturen nachvollzogen werden. Es kommen in 'in vitro'-Untersuchungen Radioisotop-markierte Kohlenhydrate zum Einsatz, wobei die Menge der einzelnen nicht-markierter Saccharide in den Kulturen reduziert und durch Isotop-markierte Monosaccharide ersetzt wird (Gilleron et al. 1990). 'In vivo' ist dieses Verfahren auf Grund seiner hohen Radioaktivitätsdosen und des raschen biologischen Metabolismus nicht geeignet. Außerdem ist die Lokalität der eingebrachten markierten Monosaccharide innerhalb des Glykans nicht bestimmbar, und eine Aussage über die Bindung an ein Lektin ist demzufolge nicht möglich. Eine ältere, funktionelle Methode, mit der die Glykane charakterisiert und strukturell identifiziert werden können, ist die Hämagglutination. Lektine mit bekannter Spezifität binden an komplementäre Oberflächenglykane von Erythrozyten, so dass bei Aggregation die Struktur der Glykane nachvollzogen werden kann.

Abgeleitet von den vorgestellten Methoden bietet sich zur exakteren Glykanbestimmung ein Test mit analogem Verlauf zur inhibitorischen Hämagglutination, nach dem Prinzip eines „kompetitiver ELISAs“, an. Er simuliert in stark vereinfachter Form die bakterielle Adhäsion an orale Oberflächen. Als „Lektinbindungs-Inhibitionstest“ ist dieser Test 1989 von KAGE et al. entwickelt und benannt worden (Kage et al. 1989). Die genauen Prinzipien und Abläufe werden in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben. Durch die Verwendung verschiedener Lektine mit bekannter Bindungsspezifität ist es möglich, über das Ausmaß der Bindungshemmung im Vergleich mit einem Standard bekannter Struktur, auf die Struktur und die Qualität der entsprechenden Oligosaccharidanteile zu schließen. Mit Hilfe einer Biotinylierung der Lektine analog dem Prinzip markierter Antikörper in einem ELISA gelingt eine Quantifizierung mit dem Streptavidin-Peroxidase-Detektions-System. Der Test hat sich bei der Analyse der Bindungsspezifisierung zwischen Lektinen und Glykanen in charakterisierender und quantifizierender Hinsicht als effektiv erwiesen und gewährt mit einer hohen Sensitivität einen Konzentrationsnachweis bis in den Mikrogramm-Bereich. Hinsichtlich des zu untersuchenden Speichels ist es möglich, Proben mit einem Volumen ab 100 µl zu verarbeiten. Im Vergleich bereitet das Pipettieren von Proben im Milliliter-Bereich jedoch weniger Schwierigkeiten, als die Verarbeitung aus Überständen sehr kleiner, zentrifugierter Proben. Dieser „Lektinbindungs-Inhibitionstest“, ein funktionelles Analyseverfahren zur Konzentrationsmessung der Glykokonjugate, fand in der durchgeführten Studie seine Anwendung.

6.6 Ergebnisse

6.6.1 Speichelmenge

ATKINSON belegte 1993, dass sich gewonnene Speichelmengen anhand ihres Gewichts genauer quantifizieren lassen als durch die Bestimmung ihres Volumens (Atkinson 1993). Das spezifische Gewicht von 1 g/cm³ ist rechnerisch einfach in die Einheit ml/min übertragbar. Die in dieser Studie erzielten, normal verteilten Speichermengenwerte liegen in ihren Darstellungen in diesen Einheiten berechnet als Mittelwerte vor, um den Vergleich mit anderen Daten der Literatur direkt zu ermöglichen. Sowohl für die kalkulatorische Gesamtspeichelmenge als auch für die Speichelflussraten der einzelnen Drüsen sind international sehr unterschiedliche Angaben ermittelt und veröffentlicht worden. Dies ist gewiss auf interindividuelle Unterschiede der Sekretionsleistung (Birkhed & Heintze 1989), auf die in Kapitel 3.4.3 erläuterten, den Speichelfluss beeinflussenden Faktoren sowie auf die Methode der Speichelgewinnung selbst (siehe Kapitel 6.5.1) zurückzuführen. Die Tabellen 15, 16 und 17 geben eine Übersicht über die Speichelflussraten bezogen auf die Glandula parotidea, die Glandulae submandibulares /-linguales bzw. den kalkulatorischen Gesamtspeichel, welche unabhängig voneinander veröffentlicht wurden. Die in den einzelnen Studien herausgearbeiteten Speichelmengenunterschiede bezüglich des Alters, des Geschlechts, der Entnahmemethoden, der Tageszeit, der kariogenen Tendenz, etc. fanden bei der Auflistung keine Beachtung. Zum Vergleich sind die jeweils durchschnittlichen Gesamtwerte der ersten beiden interventionsfreien Untersuchungstage (siehe Tabelle 13 und 14) dieser Arbeit an das Ende des entsprechenden Abschnitts angefügt.

Tabelle 15: Übersicht über Ruhe- und Reizspeichelmengen der Glandula parotidea

Autor	Jahr	Parotis – Ruhespeichel in ml/min -	Parotis – Reizspeichel in ml/min-	Stimulations- methode
Münzel	1976	0,05 (je Seite)	3-20facher Ruhewert: Ø 0,3-0,7 (je Seite)	-
Shannon et al.	1973	-	1,0	Grapefruit-Drop
Mason et al.	1975	-	1,5	Zitronensäure
Baum	1981	-	0,713-0,955 (je Seite)	2% Zitronensäure
Heft	1984	0,044-0,056 (je Seite)	0,619-0,843	2% Zitronensäure
Suber et al.	1984	-	0,32-0,36	Zitronensäuredrops
Jancke	2002	0,25 (beide Seiten)	0,25	Fahrradergometrie
Drews	2005	0,10-0,13 (je Seite)	0,20-0,22 (je Seite)	2% Zitronensäure

Tabelle 16: Übersicht über Ruhe- und Reizspeichelmengen der Glandulae submandibulares /-linguales

Autor	Jahr	Gl.submand./-ling. – Ruhespeichel in ml/min -	Gl.submand./-ling. – Reizspeichel in ml/min-	Stimulations- methode
Dawes	1969	0,26 (beide Seiten)	< 3 (beide Seiten)	Zitronensäuredrops
Ericson et al	1972	-	0,8	1% Zitronensäure
Münzel	1976	0,5	2-3facher Ruhewert	-
Pederson	1985	0,012-0,073 (je Seite)	0,085-0,282 (je Seite)	Zitronensäuredrops
Jancke	2002	0,39 (beide Seiten)	0,25 (beide Seiten)	Fahrradergometrie
Drews	2005	0,20-0,23 (je Seite)	0,31-0,36 (je Seite)	2% Zitronensäure

Tabelle 17: Übersicht über Ruhe- und Reizspeichelmengen des Gesamtspeichels

Autor	Jahr	Gesamtflussrate – Ruhespeichel in ml/min -	Gesamtflussrate – Reizspeichel in ml/min-	Stimulations-methode
Shannon & Frome	1973	0,32	1,7	Kaugummi
Anderson et al.	1974	0,39	-	-
Münzel	1976	0,33-0,5	-	-
Ericsson & Hardwick	1978	0,25-0,35	1,0-3,0	Paraffin-Kaugummi
Navazesh & Christensen	1982	0,47-0,52	1,15 2,64 2,38	Zitronensäurepapier Zitronensäuredrops Gummibasis-Kaugummi
Kashket et al.	1983	-	1,0-2,0	Paraffin-Kaugummi
Heintze et al.	1983	0,31	1,6	Paraffin-Kaugummi
Ben-Aryeh et al.	1984	0,25-0,52	1,28-1,66	2% Zitronensäure
Ewe	1987	0,5	2,3facher Ruhewert 2facher Ruhewert 7,4facher Ruhewert	Kauen Geruch Zitronensäure
Wang	1998	0,33	1,89	Paraffin-Kaugummi
Seemann	2001	0,40	0,75-0,97	Paraffin-Kaugummi
Jancke	2002	0,74	0,70	Fahrradergometrie
Drews	2005	0,64-0,68 u.V., da Ggl.minores nicht berücksichtigt	1,02-1,12 u.V., da Ggl.minores nicht berücksichtigt	2% Zitronensäure

Die in dieser Studie gemessenen Speichelmengenwerte gleich welcher Drüse lagen - wie die Übersichten zeigen - jeweils in einem Bereich, den auch andere Autoren ermittelt haben. Sie sind somit als realistisch einzuordnen. Auf Grund der gut einsehbaren und erreichbaren Austrittsöffnung des Ductus parotideus stellt sich die Gewinnung des Parotissekrets als leicht durchführbar und erfolgreich dar. Dies spricht für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien. Für die Glandula parotidea im Ruhezustand wurde eine geringfügig höhere Menge gemessen. JANCKE, der mit der gleichen Apparatur arbeitete, erzielte fast identische Mengenwerte (Jancke 2002). Dies könnte auf die direkte Platzierung der Parotissauger der Apparatur auf den Ausführungsgängen und einen somit ungewollt reflektorisch gesetzten Reiz zurückzuführen sein. Andererseits besteht bei anderen Abnahmemethoden im Gegensatz zu der hier durchgeführten die Gefahr von Speichelverlusten und einer im Mund persistierenden Restspeichelmenge, die das Ergebnis reduzieren und nachteilig verfälschen kann. Bezogen auf den Reizspeichel der Glandula parotidea zeigten sich hingegen im Vergleich zu anderen Untersuchungen, die ebenso mit einer 2% Zitronensäure als Stimulus arbeiteten, niedrigere Werte, obgleich der Stimulationsfaktor Δ stets eine erfolgreiche Stimulation mittels seiner Ergebnisse $\Delta > 1$ reflektierte. Das erzielte Ergebnis kann mit einem vergleichsmäßig geringeren Stimulus - weniger Zitronensäure in Bezug auf Menge und Frequenz - erklärt werden. Insgesamt zeichnete sich eine individuelle Schwankungsbreite ab, da einzelne Probanden trotz des niedrigen Mittelwertes bis zu 0,45 ml/min Speichel allein auf einer Seite der Glandula parotidea sezernierten.

Trotz der für die Kollektion ungünstigeren Anatomie der im Mundboden gelegenen, von der Zunge bedeckten Ausführungsgänge der Glandulae submandibulares /-linguales gewährte die in dieser Studie verwandte Apparatur eine Aufnahme mit einem hohen Maß an Vollständigkeit. Eine Verunreinigungen sowie Beeinflussungen des Speichelsekrets durch das Mundmilieu war ausgeschlossen. Die gewonnenen Speichelmengenwerte liegen im Vergleich zu anderen Autoren im mittleren Bereich. Eine vorhandene Grundstimulation bedingt den Ruhewert und die Applikation der Zitronensäure ruft eine eindeutige Steigerung der Sekretion um ca. 50% hervor, so dass diese Ergebnisse als realistisch einstuftbar sind.

In der Literatur findet man als Richtwerte, dass die Glandula parotidea anteilmäßig mit ca. 30% und die Glandulae submandibulares /-linguales mit 70% an der Gesamtspeichelmenge beteiligt sind (Sreebny 1996). Dieses Verhältnis ist auch in dieser Studie nachgewiesen worden. Durch die Stimulation stieg der Anteil des Parotissekrets auf 41% an den Vergleichstagen an. Das bedeutet, dass die Glandula parotidea in dieser Untersuchungsreihe auf stimulierende Reize in einem größeren Maße als die Glandulae submandibulares /-linguales reagiert. Es ist bekannt, dass die Glandula parotidea als phylogenetisch junge Drüse auf Reizungen relativ stärker anspricht als die Glandulae submandibulares /-linguales. Dies ist mit ihrer schnellen Anpassungsfähigkeit an neuronale Impulse zu erklären (Jancke 2002).

Die Mengen des Gesamtspeichels differieren in der Literatur weit mehr als die der einzelnen Drüsen. Laut NAVAZESH haben die verschiedenen Sammelmethode n zwar keinen

gravierenden Einfluss auf das Ergebnis (Navazesh 1982), aber die differierenden Stimulationsmethoden weisen doch einen erkennbar unterschiedlichen Effekt auf. Personen, die auf einen Stimulus mit hoher Sekretion reagieren, müssen nicht unbedingt die gleiche Speichelproduktion auf einen anderen Reiz hin aufweisen (Ericson 1969). So zeigt sich der Ruhespeichelwert dieser Studie als durchschnittlich hoch, was ggf. auf die Grundstimulation durch die Apparatur zur Speicherkollektion zurückgeführt werden kann. Trotz allem bleibt genügend reaktiver Spielraum für die einzelnen Drüsen, auf einen sekretorisch wirksamen Reiz mit einer Steigerung zu reagieren, wie es der Stimulationsfaktor zeigt. Die Reaktionsfähigkeit einer Drüse auf einen initiierten Stimulus ist mit Hilfe des Stimulationsfaktors Δ kontrollierbar. Dieser kann bei bekanntem Ruhe- und Reizspeichel berechnet werden:

$$\text{Stimulationsfaktor } \Delta = \frac{\text{Reizspeichel (g / min)}}{\text{Ruhespeichel (g / min)}}$$

Die Zitronensäure, die laut Literatur einen sehr starken Stimulus bildet (Ewe 1987), bewirkt auch in dieser Versuchsreihe eine eindeutige Erhöhung der Speichelmenge. Die hier gefundene Sekretionssteigerung ist dem mittleren Bereich zuzuordnen, was durch die ausschließlich einmalige Applikation der Säure binnen eines relativ langen Zeitintervalls von 20 Minuten bedingt sein kann. Dies ist möglicherweise im Sinne einer initialen Stimulation, die sich während dieser 20 Minuten langsam wieder reguliert, zu deuten. Zitronensäure provoziert eine sehr rasche und kurzlebige Speichelreaktion (Duran et al. 1998).

In dieser Studie zeigt sich sowohl die Reaktionsfähigkeit der Glandula parotidea als auch die der Glandulae submandibulares /-linguales als gegeben. Mit einem Mittelwert von 0,57 (siehe Tabelle 26) ist eine Steigerung der Speichelflussrate auf Grund der Stimulation nachgewiesen. Alle Versuchstage ergaben jeweils signifikante Werte beim Vergleich vor und nach Stimulation.

Tabelle 18: Übersicht über die gemittelten Stimulationsfaktoren aller Tage bezogen auf alle Drüsen

	Mittelwert (\pm Std.abw.)	Minimalwert	Maximalwert
Stimulationsfaktor Δ	0,57 (\pm 0,11)	0,33	0,84

Im Verlauf der Studie deutete sich nach Aussetzen der Mundhygiene eine signifikant ansteigende Speichelsekretion an (siehe Abbildung 14, 15 und 16). Im stimulierten Zustand ergaben die Messungen für den kalkulatorischen Gesamtspeichel einen signifikanten Anstieg von den Tagen „x“, „x+2“ und „x+5“ zum letzten Untersuchungstag „x+13“. Der Ruhespeichel

zeigte eine Augmentation von Tag „x+5“ und „x+8“ zu Tag „x+13“. Für die Glandula parotidea bestätigten sich diese Ergebnisse ausschließlich im Vergleich des Tag „x+5“ mit dem Tag „x+13“ im stimulierten Zustand. Die Balkengraphik für die Glandulae submandibulares /-linguales hingegen zeigen eine Vielzahl von Signifikanzen für den Sekretionsanstieg im Versuchsverlauf: im unstimulierten Zustand von Tag „x“, „x+5“ und „x+8“ zu Tag „x+13“ sowie im stimulierten Zustand von Tag „x“, „x+2“ und „x+5“ zum abschließenden Versuchstag.

Eine reduzierte Speichelsekretion kann als Resultat vieler verschiedener Krankheitsprozesse auftreten. Autoimmune Erkrankungen, Strahlentherapien, Diabetes, Hypertonie, Depressionen, Dehydratation, Medikamenten- bzw. Drogenkonsum stehen in dieser Studie außer Frage. Es ist bei Untersuchungen im Zusammenhang mit der oralen Zufriedenheit, dem Geschmack im Mundraum und der Speichelmenge eine signifikante Korrelation zwischen Hyposalivation und der Unzufriedenheit mit dem Geschmack ermittelt worden (Ikebe et al. 2002). Obgleich die Probanden zu Beginn der Studie ein unangenehmes orales Empfinden angaben, konnte eine temporäre Speichelmengenreduktion ca. 20 Stunden nach der letzten Zahnpflege nicht signifikant ermittelt werden. Im Vergleich äußerten die Probanden am Ende der Studie, sich an die Situation im Mundraum gewöhnt zu haben und problemlos noch einige Tage mit der Mundhygieneabstinenz fortfahren zu können.

Im Studienverlauf ergab sich bei ansteigendem Bakterien- und Plaquewachstum inklusive der sich entwickelnden Gingivitis, welche für diese Studie an Hand der klinischen Merkmale der signifikant steigenden PBI- und QH-Werte nachgewiesen wurden, eine erhöhte Speichelmengensekretion. MASON & CHISHOLM erkannten bereits 1975 ebenfalls eine z.T. exzessive Speichelsekretion bei akuten Entzündungsbedingungen im Mund (Mason & Chisholm 1975), worunter auch eine akute Gingivitis bzw. Parodontitis zu verstehen ist. Somit ist die in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte Sekretionsrate in klarem Zusammenhang mit der bewusst erzeugten bakteriellen Veränderung des Mundmilieus zu deuten. Es ergibt sich allein aus der erhöhten Speichelmenge eine größere Spülwirkung des Speichels im Sinne der körpereigenen Abwehr.

6.6.2 Glykosylierung

Der Speichel nimmt auf Grund seiner mannigfaltigen Aufgaben im oralen System, wie z.B. der Befeuchtung aller Oberflächen, der Neutralisation von Säuren, der Remineralisation der Zähne, der beginnenden Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen, seiner Spülfunktion oder seines Dienens als Gleitmittel beim Schluckvorgang, eine zentrale Stellung ein (Whelton 1996). Besonders hervorzuheben ist jedoch die Möglichkeit des menschlichen Organismus, mittels der Bestandteile des Speichels bakterielle Angriffe abzuwehren (Hay & Boowen 1996). Die Mundhöhle ist durch ihr natürliches Milieu prädestiniert für die Okkupation und die Expansion von Mikroorganismen (König 2000). Speziell der Adhäsion und späteren Invasion von Bakterien wirken Speichelmuzine entgegen (Tabak et al. 1982). Auf den Zelloberflächen des menschlichen Körpers befinden sich genetisch determinierte Kohlenhydratsequenzen in Form von Glykokonjugaten, d.h. Glykoproteinen oder auch Glykolipiden. Ein Beispiel für diese Strukturen sind die Blutgruppenantigene. Auch im Speichel kommt es zur Expression solcher Sequenzen, die bei einer mittleren Proteinkonzentration von 100 mg/ml unter Ruhebedingungen ca. 60 g Speichelglykoprotein pro Tag ausmachen. Sie besitzen entsprechend ihres spezifischen Aufbaus die Fähigkeit, an bakterielle Lektine zu binden und somit die bakterielle Adhäsion an andere Strukturen oder auch die interbakterielle Aggregation zu hemmen. Die Ergebnisse des in dieser Studie durchgeführten „Lektinbindungs-Inhibitionstests“ deuten auf eine Existenz der Lektin-spezifischen Glykokonjugate im untersuchten Speichel hin. Farbintensitäten innerhalb der Testreihe zeigten Adhäsionen zwischen Lektinen und Speichelbestandteilen auf und belegten die unterschiedlichen Potentiale der möglichen Hemmung. Die Fähigkeiten des Speichels, abhängig von der Konzentration seiner reaktiven Glykankomponenten adhäsiv oder antiadhäsiv zu wirken, sind eng miteinander verwoben. So zeigten Studien, dass primär bei steigender Konzentration der Glykokonjugate die Adhäsion gefördert, ab einem bestimmten Maß jedoch die Adhäsion immer fortschreitend gehemmt wurde (Seemann 1996). Eine lineare Beziehung zwischen der Glykankonzentration und der Schutzwirkung des Speichels existiert somit nicht. Trotz allem stellt die antiadhäsive Potenz dieser im Speichel gelösten Glykokonjugate - im Weiteren auch Lektin-Rezeptoren genannt - ein wichtiges Maß zur Beurteilung der ersten körpereigenen Barriere dar. Diese 'first line of defence' müssen die Bakterien überwinden, bevor sich im weiteren Verlauf u.a. auch Karies oder Parodontitis manifestieren können.

6.6.2.1 *Adhäsion versus Antiadhäsion*

Im Mund stellen bakterielle Keime neben den Faktoren „Wirt“, „Substrat“ und „Zeit“ einen der vier wichtigen Komponenten für die Karies und Parodontitisentstehung dar (König 2000). Eine grundlegende Voraussetzung für die Besetzung einer ökologischen Nische ist das Vermögen der Keime, an Oberflächen adhären zu können, bevor sie im Mundraum durch den Speichelstrom hinweggeschwemmt werden. Für die Adhäsion der Bakterien ist grundsätzlich

eine Spezifität ihrer Lektine in Bezug auf die oralen Oberflächenstrukturen notwendig. Für die oralen Oberflächenelemente, die von den Bakterien zur Adhäsion genutzt werden, muss daher gelten, dass sie in ihrer Struktur durch endogene oder exogene Einflüsse nicht verändert werden und an eine feste Phase gebunden sind. Wären sie frei im Medium gelöst, käme es zu einer Bindung des Lektins ohne die Adhäsion des Keims an die Zieloberfläche (Beachey 1981; Carlen et al. 1996). Um so geringer der freie Anteil von Speichelkomponenten ist, desto größer zeigt sich die Wahrscheinlichkeit, dass die oralen Mikroorganismen an die 'Pellicle'-Bestandteile adhären. Die daraus resultierende reziproke Schlussfolgerung macht sich der im Labor durchgeführte „Lektinbindungs-Inhibitionstest“ zu nutze (Kage et al. 1995): je mehr Glykokonjugate mit bestimmten bindungsfähigen Glykanstrukturen im Speichel zur Verfügung stehen, desto geringer ist die mögliche Oberflächenadhäsion der Bakterien mittels ihrer Lektine (siehe Kapitel 4.3.2.1). Durch das Maß der bakterieller Adhäsion kann die Empfänglichkeit bzw. die Resistenz eines Individuums gegenüber Karies gesteuert werden (Stenudd et al. 2001). Die gleiche Folgerung könnte auch auf das Krankheitsbild der Parodontitis übertragen werden.

In anderen Studien ist auffällig geworden, dass einige Lektin-Rezeptoren in ihrer Konzentration bei Personen mit gesteigerter Kariesaktivität bzw. vorhandener RPP erhöht sind (Seemann 1996; Carlen et al. 1998; Jancke 2002). Somit entwickelte sich die Annahme, dass Glykokonjugate auf Grund ihrer Bindung an bakterielle Lektine eine antiadhäsive Abwehrfunktion innehaben, die eine Art „Kariesresistenz“ und/ oder „Parodontitisschutz“ darstellt.

Ginge man davon aus, dass eine gleichbleibende Konzentration verschiedenster Glykokonjugate im Speichel vorzufinden ist, wäre bei gesteigerter Flüssigkeitssekretion eine Verdünnung der Konzentration zu erwarten. Die Wahrscheinlichkeit, dass Glykane mit Lektinen interagieren, würde sinken, und folglich käme es zu einer Verminderung des Adhäsionsschutzes der oralen Oberflächen. Gleiches würde gelten, wenn die Glykankonzentration gleich bleiben und die Zahl der bakteriellen Lektine im Mundraum zunehmen würde, wie es bei mangelnder Mundhygiene der Fall ist. Durch die experimentelle Gingivitis ergibt sich ein erhöhtes Risiko einer bakteriell initiierten Erkrankung.

6.6.2.2 Mundhygiene und Glykosylierung

Das Maß Lektin-spezifischer Bestandteile des Speichels in dieser Studie sollte in Abhängigkeit der Mundhygiene und somit der bakteriellen Belastung im Mundraum betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurde eine experimentelle Gingivitis erzeugt. Anhand der QH- und PBI-Werte erfolgte eine Kontrolle und Einschätzung der intraoralen, bakteriellen Entwicklung. Die Mukosa schützt wie auch die Haut als funktionelle Barriere mittels Desquamation ihrer oberflächlichsten Schicht den Organismus vor eindringenden Noxen (Madison 2003). Dieser Schutzmechanismus existiert an festen Oberflächen nicht, so dass sich auf den Zähnen ein deutliches Plaquewachstum entwickelt. Nach dem Aussetzen der Mundhygiene konnte auch in dieser

Untersuchung eine solche proliferierende Plaquebildung beobachtet werden. Die gemessenen Werte des QH stiegen ab Tag „x+5“ signifikant an, was sich bis zum letzten Untersuchungstag konstant fortsetzte. OFEK et al. haben nachgewiesen, dass eine Adhäsion von Pathogenen an die Schleimhaut, an dieser eine Entzündung hervorrufen (Ofek et al. 1977). Obgleich sich die Mundschleimhaut während dieser Studie im allgemeinen klinisch nicht auffällig veränderte, zeichnete sich im Bereich der Gingiva am Übergang zu den Zähnen und zum gingivalen Sulkus, eine deutliche Entzündung ab. Dies drückte sich auch in der signifikanten Zunahme der PBI-Werte ab Tag „x+5“ bis hin zu Tag „x+13“ aus. Demzufolge war in dieser Studie die Umsetzung des Modells der experimentellen Gingivitis erfolgreich. Die bewusst herbeigeführte „künstliche Krankheitsinitiierung“ bildet die Grundlage dafür, das Ausmaß, die Reaktivität und die Flexibilität der Glykosylierung im Speichel in Abhängigkeit der bakteriellen Augmentation zu untersuchen.

In Studien, die dieser Untersuchung vorausgingen, wurde beobachtet, dass die Glykosylierung im Speichel unterschiedlicher Probanden differiert. Forschungen an unserem Institut, Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin des Zentrums für Zahnmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Charité - Universitätsmedizin Berlin, haben erbracht, dass bei einem stark Karies belasteten Gebiss weniger Lektinrezeptoren spezifisch für das Lektin 'PNA' und mehr für das Lektin 'SNA' im Speichel vorhanden sind (Seemann 2001). Des Weiteren wurden auch Patienten mit einer 'rapid progressiv periodontitis' untersucht, die einen erhöhten Ruhekonzentrationswert an Lektinrezeptoren für das Lektin 'AAA' aufwiesen (Jancke 2002). Bezüglich der Fragen, in welchem Maß welche Drüse welche Art von Glykosylierung durchführt, und in wie weit die Drüsenproduktion vom Mundmilieu abhängt bzw. das Mundmilieu von der Drüsenproduktion, geben bislang keine Studien Aufschluss. Daher zeigt und interpretiert diese Arbeit die Änderung des Verteilungsmusters der Lektinrezeptoren im Speichel beim Übergang vom gesunden zum initiiert kranken Mundmilieu.

6.6.2.3 Mögliche Ursachen für Unterschiede im Glykosylierungsmuster

Speichel kann einen unterschiedlichen Gehalt an Glykokonjugaten aufweisen (Cohen & Levin 1989). Beim Vergleich von Ruhe- und Reizspeichel, der sich als Folge auf bestimmte mechanische, gustatorische oder olfaktorische Stimuli ergibt (Dawes 1987), veränderte sich die Glykankonzentration neben der erhöhten Speichelsekretion nicht in gleichem Maße (Kage 2000, Jancke 2002). Die Speichelmenge und die Gesamtglykokonjugatkonzentration verlaufen bezüglich ihrer Entwicklungen und Schwankungen nicht linear. Dies lässt eine reduzierte oder vermehrte Produktion und Exozytose von Glykanen vermuten. Des Weiteren zeigt eine detaillierte Betrachtung der verschiedenen Glykanstrukturen im Speichel ein differierendes Konzentrationsverhalten, sowie auch Messungen von Speichel verschiedener Individuen einen unterschiedlichen Anteil an vieler Art von Glykanen belegen (Seemann 1996, Jancke 2002).

Diese Unterschiede der Glykanstrukturen im Speichel können auf einer vermehrten Produktion von Glykoproteinen bzw. Glykolipiden beruhen oder durch eine unterschiedliche Glykosylierung auftreten. Als Ursache dafür kommen folgende Einflussmechanismen in Betracht:

- genetische
- externe, enzymatische
- regulatorische, reaktive.

Es muss als Voraussetzung gelten, dass keine krankhaften Prozesse der Speicheldrüsen bzw. andere systemische Erkrankungen vorliegen, die verändernd auf die natürliche Glykanstruktur des Speichels einwirken.

6.6.2.3.1 Genetische Einflüsse

Die interindividuellen Unterschiede in der Kohlenhydratstruktur sezernierter Glykane stellen einen Selektionsmechanismus dar, durch den der Organismus Einfluss auf die Zusammensetzung der oralen Mikroflora nehmen kann (Jensen et al. 1992). Diese Differenzen zwischen Individuen ergeben sich aus einer genetischen Prägung, welche die Struktur des Protein-Grund-Gerüsts, die Mengen der zur Verfügung stehenden Substrate und das Vorhandensein von Glykosyltransferasen beeinflussen. Diese Komponenten bilden die Grundlage für die weitere Entwicklung von Glykokonjugaten (Kornfeld & Kornfeld 1985). Abhängig von der Aktivität der Glykosyltransferasen tritt das 'posttranslational processing' in Kraft, welches endgültig über die Struktur der später sezernierten Glykane entscheidet. Hinter diesem Prozess verbergen sich mehrere aneinander gereihte Syntheseschritte, wie Sulfatierung, Phosphatierung und Glykosylierung, die jeweils aufs Neue einen Angriffspunkt für Modifikationen des Glykosylierungsmusters bilden. Fehlen z.B. bestimmte Glykosyltransferasen, können gewisse Schritte in der Glykosylierung nicht ablaufen, und es kann beispielsweise zu veränderten Glykosylierungsmustern auf Erythrozytenoberflächen und von Glykokonjugaten exokriner Drüsen kommen. Ein Beispiel hierfür bilden die so genannten Individuen vom 'non-secretor'-Typ, bei denen die Blutgruppen-spezifischen Glykokonjugate nicht exprimiert werden und somit auch im Speichel fehlen. Individuen vom 'secretor'-Typ weisen ihre spezifischen antigenen Strukturen auf den Erythrozytenoberflächen auf und sezernieren ihr Blutgruppenantigen mit in den Gesamtspeichel. Speziell die Sekrete der Glandulae minores zeigen im Verhältnis hohe Konzentrationen an Blutgruppen-spezifischen Substanzen (Ferguson 1999). Spezifisch für die Blutgruppe B ist als terminaler Speichelglykananteil D-Galaktose, für die Blutgruppe A N-Acetyl-Galaktosamin und für die Blutgruppe 0 Fucose. Welche Bedeutung demzufolge u.a. die Blutgruppe hat, kristallisierte sich in 'in vitro'-Untersuchungen heraus: Speichel von Probanden der Blutgruppe B weist eine höhere Aggregationswirkung für S.mutans auf als Speichel der Blutgruppe A (Ligtenberg et al. 1990b). Auf Grund dieses Zusammenhangs und unter dem Aspekt des 'secretor'-Status ergibt sich für die Blutgruppe B, dass 'non-secretor' durchschnittlich einen

höheren Kariesbefall als 'secretor' zeigen (Holbrook & Balckwell 1989).

Bestimmte Eigenschaften der Drüsen sind genetisch determiniert, so z.B. auch ihre Reaktivität auf stimulierende Reize. Die verschiedenen Drüsen, welche gemeinsam den Gesamtspeichel sezernieren, reagieren nicht gleichmäßig auf eine Stimulation. Es ist z.B. bekannt, dass die Proteinkonzentration des Glandulae submandibulares /-linguales-Speichels im Vergleich zur Glandula parotidea bei einer erhöhten Speichelflussrate, d.h. nach einer erfolgten Stimulation, abnimmt (Dawes 1974). Bei den in dieser Studie analysierten Glykanen hat sich das Verhältnis der Konzentrationen der Glykokonjugate ausschließlich für die Lektinrezeptoren spezifisch für 'SNA' und 'AAA' nach erfolgter Stimulation zu Gunsten der Glandula parotidea verschoben. Betrachtet wurden die Ausgangstage, an denen die Probanden ihrer gewohnheitsmäßigen Mundhygiene nachgingen. Dieses Ergebnis belegt, dass es auch Glykane gibt - in diesem Fall spezifisch für die Lektine 'PNA', 'GS1' und 'VVA' - für die die allgemein gültige Aussage von DAWES nicht gilt. Nicht nur die verschiedenen Drüsen reagieren unterschiedlich, sondern auch die Sezernierung der verschiedenen Glykane differiert. Für die Reaktivität der verschiedenen Drüsen ist der genetisch determinierte Mechanismus der neurotransmittergesteuerten Innervation der Drüsen verantwortlich. Das Mengenverteilungsmuster der sezernierten Glykanstrukturen unterliegt dieser zentral beginnenden und gesteuerten Regulation und ist vom interindividuellen Schwankungen in Bezug auf Reaktivität, Funktionalität und Intensität des neuralen Systems abhängig.

6.6.2.3.2 Externe, enzymatische Einflüsse

Die Speichelglykokonjugate entfalten nicht nur durch unterschiedliche Synthesewege innerhalb der Drüsen ihre große strukturelle Vielfalt, sondern werden auch durch dynamische Prozesse in der Mundhöhle in ihren Glykosylierungsmustern modifiziert (Levin et al. 1987). Diese strukturelle Modulation der Glykanstrukturen wird primär durch bakterielle Enzyme vermittelt, deren Effekte die bakterielle Kolonisation beeinflussen können (Cohen & Levin 1989). Einige Bakterien der Plaque aber auch Entzündungszellen aus dem Sulkusfluid, wie z.B. polymorphkernige Granulozyten, produzieren z.B. Neuraminidasen (Beighton & Whiley 1990, Kitawaki et al. 1983). Diese sind in der Lage, terminale Sialinsäuren, welche bindungsspezifisch für 'SNA' sind, abzuspalten; es kommt durch diese Demaskierung u.a. zu einer vermehrten Exposition von Galaktosylresten, die charakteristisch an die Lektine 'PNA', 'GS1' und 'VVA' binden. KITAWAKI et al. konnten zeigen, dass der Gehalt an Neuraminidase im Speichel positiv mit dem Grad der Mundhygiene korreliert (Kitawaki et al. 1983). Weitere Studien demonstrierten, dass bei schlechter Mundhygiene weniger durch Neuraminidasen abspaltbare Sialylreste im Speichel zu finden sind (Childs & Gibbons 1988). Im Gegensatz dazu hält die Speichelperoxidase die Integrität von sialylierten Glykoproteinen aufrecht, in dem sie vor der Decarboxylierung der Sialylreste durch Wasserstoffperoxid schützt (Cohen & Levin 1989). Auch Stoffe aus der Nahrung und Medikamente sind in der Lage, die Glykosylierungsmuster zu

beeinflussen und zu verändern. Es gibt Anlass zu der Vermutung, dass nicht nur chemische Einflüsse, sondern auch Temperaturschwankungen, die u.a. beim Konsum kalter Substanzen in der Mundhöhle auftreten können, den strukturellen Aufbau von Glykokonjugaten und ihre Bindungsfähigkeiten beeinflussen. 'In vitro'-Studien in unserem Institut haben gezeigt, dass Glykane und Lektine weniger stark in niedrigeren Temperaturbereichen und optimal bei Körpertemperatur ihre Bindungen eingehen (Schmidt-Westhausen 2000).

6.6.2.3.3 Regulatorische Einflüsse

Neben genetischen, externen und enzymatischen Einflüssen sind auch reaktive Veränderungen möglich. Das bislang vorgestellte Modell umschrieb die Wirkung der Glykokonjugatmenge und -struktur auf die bakterielle Adhäsion an feste, orale Oberflächen. Denkbar wäre aber auch der gegenläufige Ansatz, dass die Bakterien durch ihre Invasion, durch den Kontakt mit der Mundschleimhaut die Reaktivität der Speicheldrüsen beeinflussen. Daraus könnte sich regulatorisch eine Erhöhung des Mukus, eine veränderte Synthese der Glykokonjugate und folglich eine reaktive Modifizierung der Glykanmenge und des Glykanmusters ergeben. Bis das spezifische Immunsystem im Sinne der körpereigenen Abwehr auf bakterielle Reize reagiert, vergeht einige Zeit. Eine reflektorische Reaktion der Speicheldrüsen auf vermehrte Mikroorganismen im Mundraum könnte auch als unspezifische Abwehr im Sinne eines vorgeschalteten Schutzmechanismus, einer 'first line of defence', agieren. Auf welcher neuronalen Ebene diese Steuerung abläuft, ist nicht geklärt. Vergleichbar der oralen Schleimhaut sind die nasale und die intestinale. Eine bakterielle Belastung der Nasenschleimhaut löst ein Laufen der Nase aus; die Mukusproduktion wird angeregt. Eine Exposition der nasalen Schleimhaut mit dem Lektin 'ConA' hat eine gesteigerte Sekretion mit gleichzeitigem Auftreten von reaktivem Niesen, Jucken und Laufen der Nase ergeben (Freed 1982). Auch wurden bereits reaktive Steigerungen der Mukusproduktion auf die Exposition der Mukosa hin mit potentiell schädlichen Substanzen, wie z.B. das Cholera Toxin (Jodal et al. 1993), nachgewiesen. Der sich dahinter verbergende Regelmechanismus wird in der Literatur als 'intramural reflex' (Liewellyn-Smith 1987; Lundgren et al. 1988; Jodal et al. 1993) oder 'mucotractive effect' (Freed 1982) bezeichnet. Möglicherweise wird dieser Mechanismus über afferente c-Fasern vermittelt. Bezogen auf die in dieser Studie hinterfragten Speicheldrüsenreaktionen könnte der Effekt einer durch Bakterien erhöhten Mukusproduktion zumindest eine reduzierte Lektin-Adhäsion an die körpereigenen Oberflächen ermöglichen.

6.6.2.4 *Lektin-spezifische Glykokonjugate der Glandula parotidea versus Glandulae submandibulares /-linguales*

Die Fähigkeit der Glandula parotidea und der Glandula submandibularis Glykane, die mit Lektinen interagieren, zu produzieren, ist vielfach nachgewiesen (Whelton 1996, Procter 1998). In dieser Arbeit wurden erstmals die Konzentrationen verschiedener Lektinrezeptoren im Speichel und deren Entwicklung während einer künstlichen Krankheitsinitiierung drüsenspezifisch untersucht. Die Ergebnisse des kalkulatorischen Gesamtspeichels – so tituliert, da die Sekrete der Glandulae minores in die Untersuchung nicht einfließen – wurden denen der phylogenetisch jungen Glandula parotidea und separat denen der Glandulae submandibulares /-linguales vergleichend gegenübergestellt. Die Glandula submandibularis und die Glandula sublingualis ähneln sich in Ihrer Struktur und ihren Sekretionsmechanismen sehr, was auf die enge embryonale Entwicklung der beiden Drüsen zurückzuführen ist (Pinkstaff 1993). Sie werden daher in dieser Studie gemeinsam betrachtet.

6.6.2.4.1 **Bindungsfähigkeit von 'PNA'**

Die Bindungsspezifität des Speichels bezüglich des Lektins 'PNA' ergab im unstimulierten Zustand für die Glandulae submandibulares /-linguales signifikant abfallende Aktivitäten von Tag „x+2“ und „x+5“ zu Tag „x+13“. Das bedeutet für den β -Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin-Rezeptor, welcher dementsprechend im Vergleich mit der Ohrspeicheldrüse hauptsächlich in den Unterkiefer- und Unterzungendrüsen produziert wird, dass das Niveau der Konzentration bei einer Augmentation von Bakterien in der Mundhöhle abnimmt. Orientiert man sich an Ergebnissen anderer Studien, so publizierte SEEMANN, dass Kinder, die vermehrt unter Karies leiden, eine signifikant verminderte Glykokonjugatkonzentration spezifisch für 'PNA' im Vergleich zu kariesfreien Kindern im Gesamtspeichel aufweisen (Seemann 2001). Diese Erkenntnis korreliert mit den ermittelten Werten der vorliegenden Untersuchungsreihe: Die Entwicklung des gesunden Mundmilieus hin zur bakteriell bedingten Erkrankung kann einen erhöhten Kariesbefall nach sich ziehen, so dass letztendlich ein erniedrigter Peanut Agglutinin-spezifischer Glykokonjugat Spiegel im Mundraum analysierbar ist. Da sich eine grundlegende Änderung der Glykanstrukturen durch enzymatische oder genetische Einflüsse für diese Studie nicht erschließt, lassen die gemessenen Bindungen im Speichel vermuten, dass die Reduktion der 'PNA'-Rezeptorproduktion zumindest der Glandulae submandibulares /-linguales reflektorisch aus einer erhöhten bakteriellen Belastung im oralen System resultieren könnte.

Für die Unterkiefer-/ Unterzungendrüsen wurden des Weiteren beim Vergleich vor und nach Stimulation signifikante Konzentrations- und Sekretionsratenzunahmen für die Tage „x+5“ sowie „x+8“ bzw. „x+2“, „x+5“, „x+8“ sowie „x+13“ errechnet. Somit steigt bei Reizung der Drüsen nicht nur die Speichelmenge an. Es verschiebt sich unabhängig davon der Gehalt an Glykanen im Speichel und abhängig davon auch deren Sekretionsrate. Diese Ergebnisse lassen auf eine separate Steuerung von Flüssigkeitsmenge und Exozytose der Glykokonjugat-haltigen

Sekretgranula in den Drüsenzellen schließen. Geht man davon aus, dass durch die Stimulation die Drüse sowohl in ihrer Sekretionsleistung als auch in gleichem Maß in ihrer Glykokonjugatsynthese und -sezernierung angeregt wird, könnten sich Ergebnisse, welche Reduktionen von Glykankonzentrationen wie im Falle von β -Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin belegen, nicht ergeben. Auch haben separate Studien mit verschiedenen langen Stimulationsintervallen unterschiedliche Reaktionen der Glandulae submandibulares /-linguales in Bezug auf Glykankonzentrationen ergeben: Es wurden neben steigenden u.a. ebenfalls abfallende sowie auch gleichbleibende Konzentrationen gemessen (Becerra et al. 2003). Das durch die gustatorische Stimulationsmethode aktivierte vegetative Nervensystem gibt Anlass zur Vermutung, dass auch der cholinerge Weg eine unabhängige Synthese- und Sekretionsveränderungen innerhalb der Drüse bedingt.

Der durch hohe Kariogenität ausgezeichnete Keim *S.mutans* besitzt ein Oberflächenprotein spezifisch für terminale Galaktosylreste. Eine Senkung der neugebildeten Plaquemenge gegenüber einer Kontrollgruppe lässt sich durch mehrmalige tägliche Spülungen mit 9%iger Galaktoselösung bedingen (Nagata et al. 1982). *S.mutans* adhärirt dabei an lösliche Strukturen, bevor sich eine Anlagerung an das 'Pellicle' vollziehen kann. Auch *S.sanguis* besitzt auf seiner Oberfläche ein Galaktose-spezifisches Lektin, dessen Bindung an PRP kompetitiv sowohl durch Galaktose (= Gal) als auch durch N-Acetyl-Galaktosamin (= GalNAc) hemmbar ist (Shibata et al. 1980, Nagata et al. 1983). Die Untersuchungen dieser speziellen Bakterien zeigen, dass Lektine in der Lage sind, auch an von der bindungsspezifischen Struktur leicht abweichende Glykane zu binden. Für die gleiche Effektivität sind jedoch höhere Konzentrationen notwendig. Die Blockierung der Lektine durch Glykane reduziert sich abhängig von ihrer Struktur und Komplexizität (Murray 1982). Für das Beispiel der Galaktose bedeutet das eine verminderte Blockierung von β Gal1,3NAcGal über 1,3NAcGal zu Gal, und folglich ein höheres Potential der interbakteriellen Aggregation sowie der bakteriellen Adhäsion an humane Oberflächenstrukturen. 'PNA' aggregiert mit dem sehr spezifischen β -Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin, dessen Antiadhäsionswirkung hoch eingeschätzt werden darf. Bei einem Konzentrationsrückgang dieser Struktur im Speichel während einer erhöhten oralen bakteriellen Belastung bedeutet dies einen Verlust der Effektivität des 'PNA'-spezifischen Antiadhäsionsschutzes.

6.6.2.4.2 Bindungsfähigkeit von 'GS1'

Signifikante Ergebnisse zeichneten sich drüsenabhängig für die Bindungsfähigkeit bezüglich des *Griffonia simplicifolia* Agglutinins ab. Im Gegensatz zur Glandula parotidea, bei der durch die Messungen keine Bindungen gegenüber dem Lektin 'GS1' nachgewiesen werden konnten, ergab sich ein signifikanter Anstieg der Konzentration von Tag „x+2“ zu Tag „x+8“ für den Reizspeichel der Glandulae submandibulares /-linguales (siehe Abbildung 18). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Zunahme der Sekretionsrate von Tag „x“ zu Tag „x+5“. Obgleich

‘GS1’ eine Bindungsspezifität für α -N-Acetyl-Galaktosamin (= GalNac) aufweist, somit dem GalNac-spezifischen ‘PNA’ ähnelt, zeigte der Speichel kein äquivalentes Bindungsverhalten gegenüber diesen beiden Lektinen während einer künstlichen Krankheitsinitiierung. Während sich für ‘PNA’-Rezeptoren eine generelle Reduktion abzeichnete, deuteten die Messungen der ‘GS1’-Rezeptoren auf einen tendenziellen Anstieg nach dem Aussetzen der Mundhygiene hin. Allein der Vergleich dieser beiden Lektine ‘PNA’ und ‘GS1’ macht deutlich, dass es kein allgemeingültiges Verhalten der Speichelglykane gibt. Auch gibt es keinen Anhalt für die Existenz eines linearen Verhältnisses zwischen der jeweiligen Speichelmenge und der Glykankonzentration bzw. Sekretionsrate.

Andere Studien auf diesem Gebiet haben erbracht, dass bei unter einer ‘rapid progressiv parodontitis’ leidenden Patienten der Gehalt an ‘GS1’-Rezeptoren erhöht ist (Jancke 2002). Dieses Ergebnis korreliert mit der durchgeführten Untersuchung, bei der eine Augmentation der Bindungsfähigkeiten des Speichels gegenüber dem Lektin ‘GS1’ ermittelt wurde. Möglicherweise führt eine gesteigerte Synthese und/oder Sekretion der ‘GS1’-Rezeptoren dazu, dass während einer bakteriellen Proliferation diese ‘GS1’-spezifischen Speichelbestandteile im Rahmen einer reflektorischen Abwehrreaktion exprimiert werden können.

Im Vergleich des Ruhespeichels mit dem Reizspeichel sind signifikante Konzentrationszunahmen für ‘GS1’-Rezeptoren an den Tagen „x+8“ und „x+13“ ermittelt worden. Gleiches ergab sich für die Sekretionsraten, wobei hier zuzüglich ein Anstieg bei Tag „x“ nachweisbar war. Diese Ergebnisse erweisen sich nicht konform zu vergleichbaren Studien, bei denen keine Steigerung durch Stimulation mittels Fahrradergometrie zum Einsatz kam (Jancke 2002). Gustatorische Reize hingegen scheinen eine Konzentrationssteigerung von Lektinrezeptoren mit terminalem α -N-Acetyl-Galaktosamin zu bedingen. Der Grund ist wohl in den unterschiedlichen Innervationswegen zu suchen. Wird das vegetative Nervensystem durch eine gesteigerte körperliche Bewegung aktiviert, bildet Acetylcholin den Überträgerstoff an der präganglionären Membran, jedoch erfolgt die postganglionäre Weiterleitung über Katecholamine, und es ergibt sich für die Speicheldrüsen eine β -adrenerge Stimulation (Silbernagel & Despoulus 2003). Durch Geschmack, Berührung und Geruch laufen hingegen über das vegetative Nervensystem Afferenzen nach zentral, von wo aus elektrische Impulse die Nerven ausschließlich zu einer efferenten cholinergen Weiterleitung und Stimulation der Speicheldrüsen veranlassen (Silbernagel & Despoulus 2003). So zeigte sich, dass bei einer Aktivierung via cholinergem Weg im Gegensatz zur Übertragung mittels Katecholaminen die Speicheldrüsen mit einer Sekretionsratensteigerung in Bezug auf ‘GS1’-Rezeptoren reagierten.

6.6.2.4.3 Bindungsfähigkeit von ‘VVA’

Obleich das *Vicia villosa* Agglutinin auch eine Bindungsspezifität zu terminalen Galaktosaminen, in diesem Fall zum 1,3-N-Acetyl-Galaktosamin, besitzt, erbrachten die

Untersuchungen in dieser Studie für dieses Lektin keine verwertbaren Ergebnisse. Im Glandulae submandibulares /-linguales-Speichel deuteten sich geringste Konzentrationen und Sekretionsraten bei einer kleinen Anzahl von Probanden an, welche sich nicht im Entferntesten signifikant zeigten.

Dieses Bindungsverhalten gegenüber 'VVA' steht im Widerspruch zu anderen Studien, die das Vorhandensein von 'VVA'-Rezeptoren im Speichel postulieren. Es handelt sich in den veröffentlichten Untersuchungen häufig laut deren Angaben um Gesamtspeichel. In der hier durchgeführten Studie wurde jedoch drüsenspezifischer Speichel direkt von den Drüsenausführungsgängen abgenommen. JANCKE ermittelte bei einer drüsenspezifischen Speichelgewinnung Werte (Jancke 2002), die mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Demzufolge käme dieser Unterschied der drüsenspezifischen Abnahme als Grund in Betracht, warum keine Werte in Bezug auf 'VVA'-Rezeptoren messbar waren. Die Glandulae minores, welche in dieser Studie nicht betrachtet wurden, enthalten im Verhältnis zu ihrer geringen Sekretionsmenge sehr hohe Anteile an Proteinen (Ferguson 1999). Bei der Betrachtung des Speichels aller Drüsen wäre somit eine Verschiebung hin zu erhöhten Werten an 'VVA'-Rezeptoren denkbar. Des Weiteren kann vermutet werden, dass mit Sialinsäure maskierte terminale 1,3-N-Acetyl-Galaktosamine auch erst nach Kontakt mit Neuraminidase und somit Abspaltung des Sialylrestes in Erscheinung treten (siehe Kapitel 6.6.2.4.4). Die sich in geringsten Mengen andeutenden 'VVA'-spezifischen Speichelbindungen im Bereich der Glandulae submandibulares /-linguales lassen sich durch eine geringe Expression von 'VVA'-Rezeptoren aus den Drüsen deuten.

6.6.2.4.4 Bindungsfähigkeit von 'SNA'

Im untersuchten Speichel wurde eine sehr hohe Bindungsfähigkeit des Speichels zu Sambucus nigra Agglutinin gemessen, die auf ein sehr frequentes Auftreten von 'SNA'-spezifischen terminalen Sialinsäuren hindeutet. Die Konzentrationen der Glandulae submandibulares /-linguales waren signifikant höher als die der Glandula parotidea. Im Versuchsverlauf zeigte sich nach Stimulation ein signifikanter Anstieg von Tag „x+2“ zu Tag „x+13“. Bei Betrachtung der Sekretionsrate zeichnete sich neben einem statistisch signifikanten Anstieg von Tag „x+2“ zu Tag „x+13“ auch eine Zunahme von Tag „x+5“ zu Tag „x+13“ im Ruhezustand ab. Ebenso konnten für die addierten Speichelmengen der Glandulae majores nach Stimulation signifikante Zunahmen der Sekretionsraten von Tag „x“, „x+2“ und „x+5“ zu Tag „x+13“ belegt werden.

Es gilt als allgemein anerkannt, dass sich ein großer Anteil von Sialinsäuren unter den Monosacchariden der Speichelmuzine befindet (Herp et al. 1988). Demzufolge können die bereits an den Ausgangstagen dieser Studie gemessenen hohen Konzentrationswerte von 'SNA'-Rezeptoren als realistisch eingeordnet werden. In der Literatur wurden bereits mehrfach Untersuchungen bezüglich des Sialinsäureverhaltens im Krankheitsfall beschrieben. Z.B. zeigten sich bei Gesunden im Vergleich zu unter Gingivitis erkrankten Individuen mehr mit

Sialylresten behaftete Gingivazelloberflächen (Davis & Gibbons 1990). SEEMANN fand heraus, dass bei Kindern mit starkem Kariesbefall eine auffällig erhöhte Bindungsspezifität für das Lektin 'SNA' im Speichel messbar ist (Seemann 2001). Er interpretierte diese erhöhte Bindungsinhibition gegenüber 'SNA' als ein mögliches Zeichen einer gesteigerten Mukus- und somit Sialinsäureproduktion als Reaktion auf eine erhöhte Plaquebelastung. Diese Auslegung geht mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform, welche bei ansteigender Keimzahl im Mundmilieu, bei Formierung von Plaque - folglich einer Erhöhung des Karies- und Parodontitisrisikos - eine Zunahme der 'SNA'-spezifischen Glykane erkennen lassen.

Der Effekt der Stimulation zeichnete sich bei den Glandulae submandibulares /-linguales durch eine signifikante Erhöhung der Konzentration vom Ruhe- zum Reizspeichel an Tag „x+8“ ab. Zuzüglich ergab sich für die Sekretionsrate eine Signifikanz an Tag „x+5“. Diese ermittelten Werte belegen, dass die Drüsen trotz des sehr hohen Ausgangswertes ihre Sekretion an bindungsfähigen 'SNA'-Rezeptoren noch steigern können. Eine maximale Reaktionsfähigkeit der Drüsen ist nicht erkennbar. Die bereits geäußerte Annahme, dass die Aktivierung der Synthese- und Sekretionsmechanismen der Drüsen unabhängig von der Flüssigkeitssekretion gesteuert werden, lassen auch die für die 'SNA'-Rezeptoren ermittelten Werte erneut vermuten.

Das durch eine Erkrankung modifizierte Mundmilieu steht unter einem veränderten bakteriellen Einfluss (König 2000). Bakterien besitzen das Vermögen, Neuraminidasen produzieren zu können. Mittels dieser Enzyme können terminal sialylierte Strukturen angegriffen und abgespalten werden, was eine Konsequenz für die weitere Reaktivität der demaskierten Struktur mit sich bringt. Untersuchungen haben ergeben, dass an orale Oberflächen, die mit Neuraminidasen behandelt wurden, z.B. weniger *S.sanguis* bindet (Childs & Gibbons 1988). An die demaskierten, differierenden terminalen Bindungen adhären hingegen vermehrt parodontalpathogene Keime wie *Porphyromonas gingivalis* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Childs & Gibbons 1988). Dies bedeutet, dass durch die Abspaltung der Sialinsäuren die Adhäsion bestimmter Bakterienspezies an feste Phasen verhindert und die anderer Spezies gefördert wird. Ebenso bewirkt die Abtrennung dieser Sialylreste neben einer Erhöhung des bakteriellen Nahrungsreservoirs effektiv auch eine erhöhte Anzahl von freien Sialylsäuren im Speichel. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit freier Lektin-Glykan-Bindungen, und es ergibt sich nachfolgend ein vermehrter Abtransport der Bakterien mit dem Speichelstrom. Für den in dieser Studie untersuchten drüsenspezifischen Speichel gilt allerdings, dass er den Mundraum vor der Abnahme noch nicht erreicht hat, d.h. bislang kein bakterieller Einfluss stattfand. Es darf auf Grund der präferierten Bindung von Lektinen an komplexe Strukturen davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um freie Sialinsäuren, sondern um komplex gebundene handelt. Die hohen 'SNA'-spezifischen Werte in dieser Untersuchung sind Neuraminidase-unabhängig, rein synthese- sowie sekretionsbedingt.

6.6.2.4.5 Bindungsfähigkeit von 'AAA'

Über das Lektin *Anguilla anguilla* Agglutinin und seine Bindungsfähigkeit zu Speichelkomponenten sind in der Literatur bislang sehr wenige Untersuchungen zu finden. Bei den in dieser Versuchsreihe durchgeführten drüsenspezifischen Messungen weisen die reinen Konzentrationswerte im Vergleich der Glandulae majores auf einen höheren Anteil an 'AAA'-Rezeptoren in den Glandulae submandibulares /-linguales hin. In Abhängigkeit der Speichelmenge erbrachten alle großen Speicheldrüsen signifikante Werte für 'AAA'-Rezeptoren. Es existiert somit ein Anhalt auf terminale Fucosereste im Speichel. Im unstimulierten Zustand zeigten sowohl die Sekretionsraten des kalkulatorischen Gesamtspeichels zwischen den Tagen „x+8“ und „x+13“ eine signifikante Steigerung als auch die Messungen der Glandulae submandibulares /-linguales vom Tag „x+5“ sowie vom Tag „x+8“ zum letzten Untersuchungstag „x+13“. Gleiches Verhalten der 'AAA'-Rezeptorkonzentration ist nach erfolgter Stimulation auch für die Glandula parotidea zu erkennen, denn nach Anregung der Speichelsekretion wiesen die Sekretionsraten des kalkulatorischen Gesamtspeichels von Tag „x+8“ zu Tag „x+13“ und der Glandula parotidea von Tag „x+5“ und Tag „x+8“ zu Tag „x+13“ signifikante Zunahmen der Bindungsspezifität zu 'AAA' auf. Signifikant erhöhte 'AAA'-Rezeptorkonzentrationen der Glandulae submandibulares /-linguales wurden in anderen Arbeiten bei Patienten, die an einer 'rapid progressive periodontitis' leiden, im Vergleich zu Gesunden gemessen (Jancke 2002). Diese Erkenntnis lässt sich gut mit dem Resultat der hiesigen Untersuchung vereinbaren, dass sich in Abhängigkeit zur Speichelsekretion vom Gesunden zum Erkrankenden eine Erhöhung der 'AAA'-Rezeptorkonzentration entwickelt.

Beim Vergleich der Konzentrationen von 'AAA'-spezifischen Lektinrezeptoren vor und nach Stimulation ergaben sich Speichelmengenabhängig vielfach signifikant ansteigende Werte. Im Sekret der Glandula parotidea zeichnete sich diese Entwicklung für die Tage „x“, „x+5“, „x+8“ und „x+13“ ab, hingegen die Glandulae submandibulares /-linguales nur an Tag „x+8“ mit diesem Ergebnis aufwartete. Ähnlich verhielt sich die Sekretionsrate nach Addition des Speichels der Glandulae majores, die am letzten Versuchstag, Tag „x+13“, eine signifikante Zunahme aufwies. Andernorts wurden signifikante Zunahmen der 'AAA'-Rezeptoren ausschließlich für gesunde Probanden, die keine Parodontitis zeigten, unter β -adrenerger Stimulation angegeben (Jancke 2002). Dieses Ergebnis kann gemäß der durchgeführten Untersuchung nicht als Unterscheidungsmerkmal von Gesunden und Kranken bestätigt werden, da mehrfach nach erfolgter künstlicher Krankheitsinitiierung signifikante Sekretionsratenanstiege durch Provozierung der Speichelsekretion ermittelt wurden.

Der Lektinrezeptor spezifisch für *Anguilla anguilla* Agglutinin ist die terminale α 1,6 gebundener Fucose. Um eine Struktur mit einem terminalen Fucoserest handelt es sich ebenfalls bei dem Oberflächenantigen der Blutgruppe 0, so dass bei möglicher Exprimierung der blutgruppenspezifischen freien Antigene im Speichel auch diese Bindungen mit bakteriellen Lektinen eingehen können (Ligtenberg et al. 1990b). Das Vorhandensein solcher für 'secretor' typischen Blutgruppenstrukturen in einer Studie könnte das Ergebnis verfälschen. Eine

Grundkonzentration von Fucose im Speichel könnte auf dem 'secretor'-Status in Kombination mit der Blutgruppe 0 beruhen. Da jedoch in dieser Studie kein Blut der Probanden abgenommen wurde und somit keine 'secretor'-Bestimmung stattfand, kann diesbezüglich keine definitive Aussage getroffen werden. Es darf jedoch bei der Expression der Antigenstrukturen im Speichel von einem frequenten Niveau im Speichel ausgegangen werden, welches sich an jedem Versuchstag in gleichem Maße in den ermittelten Ergebnissen niederschlagen müsste. Der plötzliche Anstieg der Sekretionsratenwerte bezüglich der Fucosebindung im Verlauf dieser Untersuchungsreihe wäre jedoch mit dem 'secretor'-Model nicht zu erklären, und darf daher auf eine Steigerung der 'AAA'-spezifischen Glykokonjugatfraktion zurückgeführt werden.

6.7 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit hat primär das Ziel, die Reaktion des Körpers auf einen bakteriellen Anstieg im Mundraum durch die Betrachtung der Glykokonjugatkonzentration zu analysieren. Bei gesunden Probanden wurde künstlich eine Krankheit durch Vernachlässigung der Mundhygiene provoziert. Die Existenz eines körpereigenen Abwehrsystems im Sinne einer 'first line of defence' soll erörtert werden. Bakterien sind in der Lage mittels ihrer Lektine, an orale Oberflächen zu binden. Diese Adhäsion erfolgt über an die feste Phase angelagerte Glykane. Besitzen die Bakterien keine weiteren Virulenzfaktoren, können sie eine protektive Wirkung für die Mukosa darstellen, indem sie die Adhäsion anderer in einem höheren Maß pathogen wirkender Keime verhindern. Dieses positive Vermögen spezifischer Kleinstlebewesen wiegt den meist krankheitsinitiierenden Effekt der Anlagerung bakterieller Keime an die oralen Flächen allein jedoch nicht auf. Über eine bestimmte Kaskade, welche neben den „Mikroorganismen“ auch von den Faktoren „Wirt“, „Substrat“ und „Zeit“ abhängt, entwickelt sich Plaque und somit unter Umständen die beiden häufigsten Zivilisationskrankheiten Karies und/ oder Parodontitis.

Großen Einfluss auf die Entstehung der Plaque im fördernden und hemmenden Sinn hat der Speichel. Er wird von den Glandulae majores und minores abgesondert und dient den Glykokonjugaten als Trägermedium. Seine mannigfaltigen Funktionen im Mundraum bedingen das physiologische Milieu ausschlaggebend mit. In dieser Studie hat sich erwiesen, dass die Speichelmenge auf einen Anstieg der Bakterienanzahl im Mund reagiert. Sowohl die Glandula parotidea als auch die Glandulae submandibulares /-linguales produzieren ab dem ersten Tag der Krankheitsinitiierung reflektorisch mehr Speichel. Der Körper reagiert mit einer erhöhten Spülfunktion auf die orale Belastung und bringt somit u.a. auf rein mechanische Weise eine Wirtsabwehr zum Einsatz.

Wichtig ist auch das Vermögen der Drüsen, auf externe Reize reagieren zu können. Das vegetative Nervensystem wurde in dieser Arbeit an allen Untersuchungstagen mittels einer gustatorischen Stimulation angeregt, und sowohl vor als auch nach Unterlassung der

Mundhygienemaßnahmen besaßen die großen Speicheldrüsen das Vermögen, ihre Sekretion zu erhöhen. Die Glandula parotidea ist als phylogenetisch jüngere Drüse auch bei den künstlich Erkrankten verstärkt in der Lage, auf einen Reiz zu reagieren. Das bedeutet, dass trotz einer erhöhten Speichelsekretion eine Reserveaktivität der Drüsen vorhanden ist, die durch Modifikationen des Speichels das Mundmilieu neuen Situationen anpassen kann.

Gleiches gilt nicht nur für die Flüssigkeitssekretion sondern auch für die Synthese und Sekretion von Glykokonjugaten. Unabhängig von dem Verhalten der einzelnen Glykane im Versuchsverlauf, zeigten vor allem 'PNA', 'GS1' und 'SNA' eine stark erhöhte Konzentration nach cholinergischer Innervation der Drüsen. Es war weder bei der Glandula parotidea als bei den Glandulae submandibulares /-linguales eine maximale Synthese bzw. Sekretion zu erkennen, d.h. die Drüsen scheinen auch im Rahmen von Erkrankungen im Mundraum nicht an ihre Belastbarkeitsgrenzen zu stoßen. Mittels freien Lektin-Glykan-Bindungen wird die Adhäsion der Mikroorganismen an orale Strukturen inhibiert. Neben Bakterien und seltener auftretenden Toxinen kann u.a. auch die Anlagerung von *Candida albicans* an die Mundschleimhaut gehemmt werden.

Des Weiteren zeigten die Untersuchungen, dass die Glandula parotidea und die Glandulae submandibulares /-linguales in Bezug auf die Synthese und Sekretion von Glykanen im Vergleich zur Flüssigkeitssekretion des Speichels separaten Steuermechanismen unterliegen. Das Verhältnis der Speichelmenge zur Glykankonzentration änderte sich Lektin-spezifisch im Versuchsverlauf. Die Sekretion von protektiven Molekülen und von Flüssigkeit muss innerhalb der Speicheldrüsen zwar unabhängig aber synchronisiert ablaufen, um einen glykanvermittelten Adhäsionsschutz zu gewährleisten.

Diese Untersuchungsreihe hat sich zum ersten Mal mit dem Gehalt von bestimmten Glykokonjugaten bei einer akuten Keimzunahme im Mundraum befasst. Lektin-Glykan-Interaktionen bewirken eine Adhäsion, aber auch vor allem eine Antiadhäsion der Bakterien an orale Oberflächen. Die Glykankonzentration am Übergang vom „Glykan als Schutzfaktor der oralen Oberflächen“ zum „Glykan als Pathogenitätsfaktor“ gilt es noch zu definieren. Die Konzentrationen der einzelnen Glykokonjugate können daher nicht in ein lineares Verhältnis mit der protektiven Potenz gesetzt werden. Auffällig sind nach Aussetzen der Mundhygienemaßnahmen folgende Glykane geworden:

- Die Konzentration an 'PNA'-Rezeptoren war am höchsten in den Glandulae submandibulares /-linguales und nahm stetig im Laufe der Versuchsreihe ab. Da der 'PNA'-Rezeptor eine hohe Effektivität in Bezug auf die Lektin-Glykan-Bindung besitzt, reduziert sich die antiadhäsive Schutzwirkung gegenüber Parodontalpathogenen bei ansteigender bakterieller Belastung.
- Obgleich das Lektin 'GS1' wie auch 'PNA' eine Bindungsspezifität für GalNAc aufweist, zeigten beide kein äquivalentes Bindungsverhalten. In den Glandulae submandibulares /

-linguales zeichnete sich eine Zunahme der 'GS1'-spezifischen Rezeptoren ab. Ebenso ergab sich eine Konzentrations- und Sekretionssteigerung nach erfolgter Stimulation durch einen gustatorischen Reiz. Dieses Resultat verhält sich konform mit anderen Studien.

- Bei der drüsenspezifischen Kollektion des Speichels innerhalb dieser Arbeit konnten für das Lektin 'VVA' keine entsprechenden bindungsfähigen Glykankonzentrationen gemessen werden. Da Literaturangaben jedoch nachweislich terminale 1,3-N-Acetyl-Galaktosamine im Gesamtspeichel belegen, wäre dies mit einer Produktion dieser Strukturen durch die Glandulae minores zu erklären. Diese wurden in dieser Studie nicht erfasst. Des Weiteren wäre eine Modifikation der in den Glandulae majores synthetisierten Glykanen nach Verlassen der Drüsen denkbar. Eine Maskierung der 'VVA'-spezifischen Rezeptoren mittels Sialinsäuren stünde mit dieser Annahme im Einklang.
- Für 'SNA' lag im Speichel eine sehr hohe Konzentration an bindungsfähigen Glykokonjugaten vor, die im Versuchsverlauf auch stetig anstiegen. Da bakterielle Neuraminidasen 'SNA'-spezifische Rezeptoren durch Abspaltung der terminalen Sialinsäuren demaskieren können und somit weitere spezifische Glykokonjugate mit differenten Terminalstrukturen entstehen, lassen sich die 'SNA'-Rezeptoren als eine Art 'all round'-Schutz einordnen. Sie bilden indirekt eine weit gefächerte Abwehr u.a. gegen kariogene und parodontogene Keime.
- Durch die künstliche Krankheitsinitiierung ergaben sich im Versuchsverlauf für das Lektin 'AAA' signifikante Ergebnisse: Sowohl für die Glandula parotidea als auch für die Glandulae submandibulares /-linguales zeigte sich eine Zunahme der terminalen Fucosereste in Abhängigkeit der Speichelmenge durch die Vernachlässigung der Mundhygiene. Des Weiteren konnten alle Konzentrationswerte jeweils durch eine initiierte Stimulation signifikant gesteigert werden. Dies spricht für eine eigenständig, aber auch synchron mit der Flüssigkeitssekretion ablaufende 'AAA'-spezifische Glykokonjugatsynthese. Eine relativ hohe Grundkonzentration der terminalen Fucosereste könnte mit der bei 'secretor'-Typen der Blutgruppe 0 vorkommenden Expression von oberflächlichen Fucosestrukturen vergesellschaftet sein. Ein genereller Anstieg der 'AAA'-Rezeptoren bei Zunahme der Bakterienzahl im Mundraum lässt sich jedoch nicht über das 'secretor'-Modell sondern plausibler über eine Veränderung der Glykankonzentration erklären.

Die sich im Versuchsverlauf gezeigten Verschiebungen der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Lektin-spezifischen Rezeptoren sprechen für einen bakteriellen Einfluss auf die Glykokonjugatnsynthese bzw. für eine Reaktion des Organismus auf eine bakterielle intraorale Veränderung. Da die Glykane auf Grund ihrer inhibierenden Adhäsion zu verschiedensten oft pathogenen Mikroorganismen eine für den menschlichen Körper protektive Wirkung aufweisen, darf von einer Existenz einer primären Abwehrreaktion ausgegangen

werden. Diese ist dem verzögert einsetzenden Immunsystem vorgeschaltet und wird als 'first line of defence' bezeichnet. Auf das veränderte Mundmilieu reagieren die Drüsen mit einer mengen- und konzentrationsmäßig veränderten Sekretion. Es zeichneten sich Effekte sowohl für die Glandula parotidea als auch für die Glandulae submandibulares /-linguales ab, so dass beide Drüsen diesem Reflexmuster unterstehen. Welcher Form diese Reflexe sind, bleibt weiter zu untersuchen. Adäquat zu anderen Schleimhäuten des Körpers ist ein c-Faser geleiteter 'intramural reflex' gut vorstellbar.

6.8 Perspektiven

Auf Grund der protektiven Wirkung der Speichelglykokonjugate für das orale System resultiert aus einer konstitutiven Speichelreduktion oder auch nur aus einem temporären Verlust des relativen Adhäsionsschutzes auf Grund veränderter Speichelkomponenten ein erhöhtes Risiko in Bezug auf pathogeninduzierte Erkrankungen. Folglich ist die detaillierte Erkenntnis über die Strukturen der spezifischen Glykokonjugate und über die ihre Synthese sowie Sekretion beeinflussenden Faktoren aus Karies- und Parodontitis-präventiver Sicht von wertvoller Bedeutung. Neben den bislang bekannten bakteriellen Lektinen, wie u.a. 'PNA', 'GS1', 'VVA', 'SNA' und 'AAA', mit ihren spezifischen Rezeptoren, bedarf es weiterer Forschung, welche Glykokonjugatstrukturen für die Antiadhäsion welcher Keime verantwortlich sind. Auch die Reaktivität und die enzymatischen Einflüsse einzelner Bakterienspezies auf die Lektinrezeptoren sind weit über die Neuraminidaseaktivität zu hinterfragen.

Bislang gibt es keine Studien, die sich mit dem Ausmaß der unabhängigen Glykanproduktion der Speicheldrüsen in Abhängigkeit zum oralen Milieu beschäftigen. Da aber gerade das Verhalten dieser Strukturen eine wichtige Abwehrfunktion des Körpers bildet, sollten diesem Gebiet weitere Forschungsarbeiten gewidmet werden. Z.B. bleibt es herauszufinden, ob das Glykansynthesevermögen der Drüsen im Alter sinkt, wo doch die Inzidenz der Parodontopathien mit dem Alter steigt. Auch sollte der Stellenwert der Glandulae minores, die mittels ihrer multiplen Ausführungsgänge die Mukosa direkt mit ihrem mukösen Sekret benetzen, bezüglich der Glykokonjugateinflüsse erfasst werden.

Den Muzinen mit ihren Glykananteilen als körpereigene Bestandteile sind bislang keine negativen Wirkungen auf den Organismus nachgewiesen worden. Demzufolge wäre ihr Einsatz bzw. der Einsatz ihrer Produkte als therapeutischer Schutz bei Infektionen und Entzündungen der Mundschleimhaut sowie bei Patienten mit hohem Karies- und/ oder Parodontitisrisiko denkbar. Auch im Bereich der immer wichtiger werdenden oralen Prophylaxe bietet sich der Einsatz von spezifischen, löslichen Glykanen als physiologischer Protektionsfaktor an.

7 Literaturverzeichnis

1. **Abeygunawardana C, Bush CA, Cisar JO; 1991;**
‘Complete structure of the cell surface polysaccharide of streptococcus oralis C104: A 600-MHz NMR Study’; *Biochemistry*, 30: 8568-8577.
2. **Absolom DR, Lamberti, Policova Z, Zingg W, van Oss CJ, Neumann AW; 1983;**
‘Surface thermodynamics of bacterial adhesion’; *Appl Env Microbiol*; 46: 90-97.
3. **Accili D, Menghi G, Bondi AM, Scocco P; 1992;**
‘Glycoconjugate composition of mammalian parotid glands elucidated in situ by lectins and glycosidases’; *Acta Histochem*; 92(2): 196-206;
4. **Ackermans F, Klein JP, Ogier JA, Bazin H, Cormont F, Frank RM; 1985;**
‘Purification and characterization of a saliva interacting cell wall protein from Streptococcus mutans serotype f by using monoclonal antibody immunoaffinity chromatography’; *Biochem J*; 228: 211-217;
5. **Anderson R, Arvidsson E, Crossner C, Holm A, Månsson B, Grahnén H; 1974;**
‘The flow rate, pH and buffer effect of mixed saliva in children’; *J Int Dent Child*; 5: 5-12;
6. **Anderson MW, Kang Y, Lockwich T; 1981;**
‘Parotid gland pathophysiology after mixed gamma and neutron irradiation of cancer patients’; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 52: 495-500;
7. **Anderson DJ, Hector MP, Linden RWA; 1985;**
‘The possible relation between mastication and parotid secretion in the rabbit’; *J Physiol (London)*; 364: 19;
8. **Applebaum B, Golub E, Holt SC, Rosan B; 1979;**
‘In vitro studies of dental plaque formation. Adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite’; *INFECT Immun*; 25: 717-728;
9. **Arends J, Jongebloed WL; 1977;**
‘The enamel substance - characteristics of the enamel surface’; *Swed Dent J*; 1: 215-224;
10. **Armitage GC; 1999;**
‘Development of Classification System for Periodontal Disease and Conditions’; *Annual of Periodontology*; 4: 1-6;
11. **Ashwell G, Morell AG; 1974;**
‘The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins’; *Adv Enzymol*; 41: 99-128;
12. **Asikainen S; 1986;**
‘Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis’; *J Periodontol*; 57: 537-541;

13. **Atkinson JC, Fox PC; 1992;**
 'Salivary gland dysfunction'; Clin Geriatr Med; 8: 499-511;
14. **Axelsson P, Lindhe J; 1978;**
 'Effects of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults'; J Clin Periodontol; 68: 133-151;
15. **Azen EA; 1989;**
 'Genetic protein polymorphisms of human saliva'; Tenovuo JO; Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology; Vol.1; CRC Press; Florida; USA;
16. **Ballagh RH, Kudryk KG, Lampe HB, Moriarty B, Mackay A, Burford MA, Dardick I; 1994;**
 'The pathobiology of salivary glands. III.PCNA-localization of cycling cells induced in rat submandibular gland by low-dose x-radiation'; Oral SurgOral Med Oral Pathol; 77: 27-35;
17. **Baum BJ; 1981;**
 'Evaluation of stimulated parotid saliva flow rate in different age groups'; J Dent Res; 60(7): 1292-1296;
18. **Baum BJ, Yeh CK, Kousvelari EE; 1990;**
 'Influence of beta-adrenergic stimulation on glycosylation of a major, secretory N-linked glycoprotein from rat parotid salivary gland'; Arch Oral Biol; 35: 201-207;
19. **Beachey EH; 1981;**
 'Bacterial Adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces'; J Infect Diseases; 143: 325-344;
20. **Becerra L, Soares RV, Bruno LS, Siqueira CC, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF; 2003;**
 'Patterns of secretion of mucins and non-mucin glycoproteins in human submandibular/sublingual secretion'; Arch Oral Biol; 48(2): 147-154;
21. **Beighton D, Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Johnson MW, Wilton JMA; 1989;**
 'Associations between salivary levels of Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, lactobacilli and caries experience on Kenyan adolescents'; J Dent Res; 68: 1242-1246;
22. **Beighton D, Whiley RA; 1990;**
 'Sialidase activity of the "Streptococcus milleri group" and other viridans group streptococci'; J Clin Microbiol; 28: 1431-1433;
23. **Ben-Aryeh H, Miron D, Szargel R, Gutman D; 1984;**
 'Whole-saliva secretion rates in old and young healthy subjects'; J Dent Res; 63(9): 1147-1148;
24. **Bennick A, Mc Laughlin AC, Grey AA, Madapallimattan G; 1981;**
 'The location and nature of calcium-bindings sites in salivary acidic proline rich phosphoproteins'; J Biol Chem; 256: 4741-4746;
25. **Bennick A; 1987;**

- ‘Structural and genetic aspects of proline-rich proteins’; J Dent Res; 66: 457-461;
26. **Bergdahl M; 2000;**
‘Salivary flow and oral complaints in adult dental patients’; Community Dent Oral Epidemiol; 28(1): 59-66;
27. **Bernardi G, Kawasaki T; 1968;**
‘Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns’; Biochem Biophys Acta; 160: 301-310;
28. **Biol MC, Pintori S, Mathian B, Louisot P; 1991;**
‘Dietary regulation of intestinal glycosyltransferase activities: relation between development changes and weaning in rats’; J Nutr; 121: 114-125;
29. **Birkhed D, Heintze U; 1989;**
‘Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH’; Tenovuo JO; Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology; Vol.1; CRC Press; Florida; USA;
30. **Boros I, Keszler P, Zelles T; 1999;**
‘Study of saliva secretion and the salivary fluoride concentration of the human minor labial glands by a new method’; Arch Orl Biol; 44 Suppl 1: S59-62;
31. **Börsch G; 1984;**
‘Der Gastrointestinaltrakt als Immunorgan’; Klin Wschr; 62: 699-709;
32. **Bourdiol P, Mioche L, Monier S; 2004;**
‘Effect of age on salivary flow obtained under feeding and non-feeding conditions’; J Oral Rehabil; 31(5): 445-52;
33. **Bowen WH; 1968;**
‘Dental caries in monkeys’; Adv Oral Biol; 3: 185-216;
34. **Bowen WH, Madison M, Pearson SK; 1988;**
‘Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates’; J Dent Res; 67: 1316-1318;
35. **Bowen WH; 1996;**
‘Salivary Influences on the Oral Microflora’; Saliva and Oral Health; 2nd ed.; British Dental Journal; Great Britain; 95-103;
36. **Bratthal D; 1969;**
‘Immunodiffusion studies on serologic specificity of streptococci resembling Streptococcus mutans’; Odontol Rev; 20: 231-243;
37. **Bratthal D; 1970;**
‘Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling Streptococcus mutans’; Odontol Rev; 21: 143-152;
38. **Buddecke E; 1981;**

- 'Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin'; De Gruyter; Berlin;
39. **Buischi YA, Axelsson P, Barbosa M, Nayer MP, Prado MC; 1989;**
'Salivary Streptococcus mutans and caries prevalence in Brazilian schoolchildren'; Comm Dent Oral Epidemiol; 17: 28-30;
40. **Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh; 1872;**
'Ion-binding proteins in milk and resistance to Escherichia coli infections in infants'; Brit Med J; 1: 69-75;
41. **Busscher HJ, Weerkamp AH; 1987;**
'Specific and nonspecific interactions in bacterial adhesion to solid substrata'; FEMS Microbiol Lett; 46: 165-173;
42. **Capasso JM, Hirschberg CB; 1984;**
'Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane'; Proc Natl Acad Sci USA; 81: 7051-7055;
43. **Carlen A, Olsson J, Ramberg P; 1996;**
'Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis and Actinomyces spp, in young and elderly humans'; Arch Oral Biol; 41(12): 1133-1140;
44. **Carlen A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J, Stromberg N; 1998;**
'Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces'; J Dent Res; 77(1): 81-90;
45. **Carlson AJ, Crittenden AL; 1910;**
'The relation of ptyalin concentration to the diet and to the rate of secretion of the saliva'; Amer J Physiol; 26: 169;
46. **Carlsson J; 1980;**
'Symbiosis between host and microorganisms in the oral cavity'; Scand J Infect Dis; 24: 74-78;
47. **Carlsson P, Olsson B, Bratthal D; 1985;**
'The relationship between the bacterium Streptococcus mutans in the saliva and dental caries'; Arch Oral Biol; 30: 265-268;
48. **Carlsson J; 1989;**
'Microbiology of plaque associated periodontal disease'; Lindhe J; Textbook of Clinical Periodontology; Munksgaard, Copenhagen;
49. **Carpenter GH, Proctor GB; 1999;**
'O-linked glycosylation occurs on basic parotid salivary proline-rich proteins'; Oral Microbiol Immunol; 14(5): 309-315;
50. **Childers NK, Tong G, Li F, Dasanayake AP, Kirk K, Michalek SM; 2001;**

- ‘Humans immunized with Streptococcus mutans antigens by mucosal routes’; J Dent Res; 81: 1: 48-52;
51. **Childs WC, Gibbons RJ; 1988;**
‘Use of percoll density gradients for studying the attachment of bacteria to oral epithelial cells’;
J Dent Res; 67: 826-830;
52. **Chrispeels MJ, Raikhel NV; 1991;**
‘Lectins, lectin genes, and their role in plant defence’; Plant Cell; 3: 1-9;
53. **Cimasoni G; 1983;**
‘Crevicula fluid update’; Oral Sci.; 12: 111-152;
54. **Cimasoni G, Giannopoulos C; 1988;**
‘Can crevicular fluid component analysis assist in diagnosis and monitoring periodontal breakdown?’; Periodontology Today; Int Congr, Zürich, Karger; Basel; 260-270;
55. **Clark WB, Bamman LL, Gibbons RJ; 1978;**
‘Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites in hydroxyapatite surfaces’;
Infect Immun; 19: 846-853;
56. **Cohen RE, Levine MJ; 1989;**
‘Salivary Glycoproteins’; Tenovuo JO; Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology;
Vol.1; CRC Press; Florida; USA;
57. **Coudert JL, Lissac M, Parret J; 1986;**
‘A new appliance for the collection of human submandibular saliva’; Arch Oral Biol; 31: 411-413;
58. **Coughlan CM, Breen KC; 1995;**
‘The control of sialyltransferase activity in tumor-cell lines derived from different tissues in multifactorial’; FEBS Lett; 369: 260-262;
59. **Coykendall AL; 1974;**
‘Four types of Streptococcus mutans based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics’; J Gen Microbiol; 83: 327-338;
60. **Coykendall AL; 1977;**
‘Proposal to elevate the subspecies of Streptococcus mutans to species status, based on their molecular composition’; Int J Syst Bacteriol; 27: 26-30;
61. **Coykendall AL; 1984;**
‘Streptococcus sobrinus nom. rev. and Streptococcus ferus nom. rev.: Habitat for these and others mutans streptococci’; Int J Syst Bacteriol; 34: 332;
62. **Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russell MW, Modoveanu Z, McGhee JR, Mestecky JR; 1987;**
‘IgA antibody producing cells in peripheral blood after antigen ingestions: Evidence for a

- common mucosal immune system in humans'; *Proc Natl Acad Sci USA*; **84**: 2449-2453;
63. **Dahle UR, Tronstad L, Olson I; 1993;**
'Spirochaetes in oral infections'; *Endont Dent Traumatol*; **9**: 87-94;
64. **Dahlen G, Bjorkander J, Gahnberg L, Slots J, Hanson LA; 1993;**
'Periodontal disease and dental caries in relation to primary IgG subclass and other humoral immunodeficiencies'; *J Clin Periodontol*; **20**: 7-13;
65. **Davis G, Gibbons RJ; 1990;**
'Accessible sialic acid content of oral epithel cells from healthy and gingivitis subjects'; *J Periodont Res*; **25**: 250-253;
66. **Dawes C; 1969;**
'The effect of flow rate and duration of stimulation on the concentration of protein and the main electrolytes in human parotid saliva'; *Archs Oral Biol*; **14**: 277-294;
67. **Dawes C; 1970;**
'Effects of diet on salivary secretion and composition'; *J Dent Res*; **49**: 1263;
68. **Dawes C; 1974;**
'The effects of low flow rate and duration of stimulation on the concentration of protein and the main electrolytes in human submandibular saliva'; *Arch Oral Biol*; **14**: 277;
69. **Dawes C; 1985;**
'Saliva and dental caries'; Nikiforuk G, *Understanding dental caries, 1 Etiology and mechanisms, Basic clinical aspects*; Vol.1; Basel; Karger; 236-260;
70. **Dawes C; 1987;**
'Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man'; *J Dent Res*; **66**: 648-653;
71. **Dawes C; 1996;**
'Factors Influencing Salivary Flow Rate and Composition'; in Edgar WM, O'Mullane DM; 'Saliva and oral health'; *Brit Dent J*; London; Geat Britain; **2**: 27-41;
72. **Dawes C, O'Connor AM, Aspen JM; 2000;**
'The effect of human salivary flow rate of the temperature of a gustatory stimulus'; *Arch Oral Biol*; **45(11)**: 957-961;
73. **Demuth DR, Golub EE, Malamud D; 1990a;**
'Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a Streptococcus sanguis receptor for a human salivary glycoprotein'; *J Biol Chem*; **265**: 7120-7126;
74. **Demuth DR, Lammey MS, Huck M, Lally ET, Malamud D; 1990b;**
'Comparison of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis receptors for human agglutinin'; *Microbial Pathogen*; **9**: 199-211;
75. **Doyle RJ, Nesbitt WE, Taylor KG; 1982;**

- ‘On the mechanism of adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite’; FEMS microbiol Lett; 15: 1-5;
76. **Dua VK, Rao BN, Wu SS, Dube VE, Bush CA; 1986;**
‘Characterization of the oligosaccharide alditol from ovarian cyst mucin glycoproteins of group A using high pressure liquid chromatography (HPLC) and high field ¹H NMR spectroscopy’; J Biol Chem; 261: 1599-1608;
77. **Duran V, Dominguez P, Morales I, Lopez RO; 1998;**
‘Kinetic assessment of salivary secretory response to citric acid. Differences with pilocarpin’; Rev Med Chil; 126(11): 1330-1337;
78. **Dzink JL, Tanner ACR, Socransky SS, Haffajee AD; 1985;**
‘Gram negative species associated with active periodontal lesions’; J Clin Periodontologie; 12: 648-659;
79. **Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD; 1988;**
‘The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease’; J Clin Periodontologie; 15: 316-323;
80. **Edgar WM; 1992;**
‘Saliva: its secretion, compositions and function’; Br Dent J; 172: 305-312;
81. **Eisenberg AD, Mundorff SA, Featherstone JDB, Leverett DH, Adair SM, Billings RJ, Proskin HM; 1991;**
‘Association of microbial factors and plaque index with caries prevalence and water fluoridation status’; Oral Microbiol Immunol; 6: 139-145;
82. **Ellen RP; 1985;**
‘Specificity of attachment as a tissue-tropic influence on oral bacteria’; Mergenhagen SE; Rosan B: ‘Molecular basis of oral microbial adhesion’; Am Soc Microbiol; Washington DC; 33-39;
83. **Ellen RP, Sivendra R; 1985;**
‘In vitro attachment, salivary agglutination, and surface fibril density of fresh *Actinomyces* isolates from two distinct oral surfaces’; J Dent Res; 64: 799-803;
84. **Eneroth CM, Hokfelt T, Norberg KA; 1969;**
‘The role of the parasympathetic and sympathetic innervation for the secretion of human parotid and submandibular glands’; Acta Otolaryngol.; Stockh; 68: 369-375;
85. **Ericson S; 1969;**
‘An investigation of human parotid secretion rate in response to different types of stimulation’; Arch Oral Biol; 14: 591;
86. **Ericson S, Wiberg A; 1972;**
‘The secretory rate of the human submandibular glands in response to parasympathicomimetic

- and gustatory stimulation'; Arch Oral Biol; 17(12): 1715-1720;
87. **Ericson T, Mäkinen KK; 1986;**
 'Saliva - formation, composition and possible role'; Thylstrup A; Fejerskov O; Textbook of cariology; Munksgaard; Kopenhagen; 28-45;
 88. **Ericsson Y, Hardwick L; 1978;**
 'Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention'; Caries Res; 12 (Suppl. 1): 94;
 89. **Fan MW; 1993;**
 'Effect of neuraminidase on the adherence of S.mutans to salivary pellicle'; Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih; 28: 209-211, abstr 254;
 90. **Ferguson DB; 1999;**
 'The flow rate and composition of human labial gland saliva'; Arch Oral Biol; 44 Suppl 1: S11-14;
 91. **Fitzgerald RJ, Keyes PH; 1960;**
 'Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster'; J Am Dent Assoc; 61: 9-19;
 92. **Fitzgerald RJ; 1968;**
 'Dental Research in gnotobiotic animals'; Caries Res; 2: 139-146;
 93. **Forester H, Hunter N, Knox KW; 1983;**
 'Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of Streptococcus mutans'; J Gen Microbiol; 129: 2779-2788;
 94. **Franz H; 1992;**
 'Schwerpunkt Immunologie, Folge11: Lektine'; MTA; 7;
 95. **Freed DLJ; 1982;**
 'Lectins, allergens and mucus'; in Horowitz MI, Pigman W: 'Lectins – biology, biochemistry, clinical biochemistry'; Vol.2; Walter de Gruyter; Berlin-New York; 33-43;
 96. **Freter R, Jones GW; 1983;**
 'Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis'; Rev Infect Dis, 5: 647-658;
 97. **Friedland AH, Marder SR, Pisegna JR, Yagiela JA; 2003;**
 'Alcohol abuse and dependence: psychopathology, medical management and dental implication'; J Am Dent Assoc; 134(6): 731-740;
 98. **Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M; 2003;**
 'Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique'; Forensic Sci Int; 134(1): 40-45;
 99. **Garrett JR, Anderson LC; 1991;**

- ‘Rat sublingual salivary glands: secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts’; *Arch Oral Biol*; 36: 675-683;
100. **Geddes DAM, Rölla G; 1988;**
‘Fluoride in teeth and bone’; Eksstrand J, Fejerskov O, Silverstone L: ‘Fluoride in dentistry’; Munksgaard; Kopenhagen; 60-76;
101. **Gibbons RJ, van Houte J; 1975;**
‘Bacterial adherence in oral microbial ecology’; *Ann Rev Microbiol*; 29: 1214-1217;
102. **Gibbons RJ, Qureshi JV; 1979;**
‘Inhibition of adsorption of *Streptococcus mutans* strains to saliva-treated hydroxyapatite by galactose and certain amines’; *Infect Immun*; 26: 1214-1217;
103. **Gibbons RJ; 1980;**
‘Adhesion of bacteria to surfaces of the mouth’; Berkley RCW, Lynch JM, Melling J, Rutter PR, Vincent B: ‘Microbial adhesion to surfaces’; Ellis Horwood, Ltd; Chichester; England; 351-388;
104. **Gibbons RJ, Dankers I; 1982;**
‘Inhibition of lectin-binding to saliva-treated hydroxyapatite, to buccal epithelial cells, and to erythrocytes by salivary components’; *Am J Clin Nutr*; 36: 276-293;
105. **Gibbons RJ, Etherden I; 1982;**
‘Enzymatic modification of bacterial receptors on saliva treated hydroxyapatite surfaces’; *Infect Immun*; 36: 52-58;
106. **Gibbons RJ, Etherden I; 1983;**
‘Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles’; *Infect Immun*; 41(3): 1190-1196;
105. **Gibbons RJ, Etherden I, Moreno EC; 1985;**
‘Contribution of stereochemical interactions in the adhesion of *Streptococcus sanguis* C5 to experimental pellicle’; *J Dent Res*; 64: 96-101;
106. **Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI; 1986;**
‘Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors’; *Infect Immun*; 52: 555-561;
107. **Gibbons RJ; 1989;**
‘Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious disease’; *J Dent Res*; 68: 750-760;
108. **Gibbons RJ, Hay DI; 1989;**
‘Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contributes to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces’; *J Dent Res*; 68: 1303-1307;
109. **Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH; 1991;**
‘Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes

- adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces'; *Infect Immun*; 59: 2948-2954;
110. **Gilleron M, Venisse A, Riviere M, Servin P, Puzo G; 1990;**
'Carbohydrate epitope structural elucidation by 1H-NMR spectroscopy of a new *Mycobacterium kansasii* phenolic glycolipid antigen'; *Eur J Biochem*; 193: 449-457;
111. **Graf H; 1970;**
'The glycolytic activity of plaque and its relation to hard tissues pathology - recent findings from intraoral pH telemetry research'; *Int Dent J*; 20: 425-435;
112. **Greenstein G, Caton J, Polson AM; 1981;**
'Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation'; *J Periodontol*; 52: 420-425;
113. **Grönblad EA; 1982;**
'Concentration of immunoglobulins in human whole saliva: effect of physiological stimulation'; *Acta Odontol Scand*; 40: 87-95;
114. **Gustafsson BE, Quensel CE, Lanks LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B; 1954;**
'The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years (Sweden)'; *Acta Odontol Scand*; 11: 232-364;
115. **Gutteridge JMC, Paterson SK, Segal AW, Halliwell B; 1981;**
'Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin'; *Biochem J*; 199: 259-261;
116. **Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubmann MA, Ebersole JL, Smith DJ; 1988;**
'Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases'; *J Clinical Periodontol*; 15: 240-246;
117. **Hägewald S, Bernimoulin JP, Köttgen E, Kage A; 2000;**
'Total IgA and *Porphyromonas gingivalis*-reactive IgA in the saliva of patients with generalised early-onset periodontitis'; *Euro J of Oral Sciences*; 108: 2: 147-153;
118. **Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW; 1992;**
'Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I/II. Reversal by IgA1 protease cleavage'; *Infect Immun*; 60: 5057-5064;
119. **Hajishengallis G, Koga T, Russel MW; 1994;**
'Affinity and specificity of the interactions between *Streptococcus mutans* antigen I/II and salivary components'; *J Dent Res*; 73: 1493-1502;
120. **Hajishengallis G, Michalek SM; 1999;**
'Current status of mucosal vaccine against dental caries'; *Oral Microbial Immunol*; 14: 1-20;
121. **Hamilton IR, Bowden G; 1988;**
'Effect of fluoride on oral microorganisms'; Eksstrand J, Fejerskov O, Silverstone L: 'Fluoride in

- dentistry'; Munksgaard; Kopenhagen; 77-103;
122. **Hannig M; 1994;**
'Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel'; Oralprophylaxe; 16: 39-46;
123. **Hannig M; 2001;**
'Neues zum Thema Immunisierung gegen Karies'; zm - zahnärztliche Mitteilungen; 10: 28-32;
124. **Hardie JM; 1992;**
'Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease'; Br Dent J; 172: 271-278;
125. **Hauser KC, Albegger K, Saria A, Hacker GW; 1992;**
'Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands'; Acta Otolaryngol.; Stockholm; 112: 343-348;
126. **Hay DI, Smith DJ, Schluckebier SK, Moreno EC; 1984;**
'Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva'; J Dent Res; 63;
127. **Hay DI, Moreno EC; 1989;**
'Statherin and the acidic proline-rich proteins.'; Tenovuo JO; Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology; Vol.1; CRC Press; Florida; USA;
128. **Hay DI, Bowen WH; 1996;**
'The functions of salivary proteins'; Edgar WM & O'Mullane DM; Saliva and oral health; Brit Dent J; London; Great Britain; 2: 105-122;
129. **Heft MW, Baum BJ; 1984;**
'Unstimulated and stimulated salivary flow rate in individuals of different ages'; J Dent Res; 63 (10): 1182 – 1185;
130. **Heintze U, Birkhed D, Björn H; 1983**
'Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex'; Swed Dent; 7: 227-238;
131. **Heintze U; 1984;**
'Secretion rate, buffer effect and number of lactobacilli and Streptococcus mutans of whole saliva of cigarette smokers and non-smokers'; Scand J Dent; 92: 294;
132. **Hellden L, Salonen L, Gustafsson I; 1989;**
'Oral health in an adult Swedish population. Prevalence of teeth, removable dentures and occlusal supporting zones'; Swed Dent J; 13: 45-60;
133. **Herp A, Borelli C, Wu AM; 1988;**
'Biochemistry and lectin binding properties of mammalian salivary mucous glycoproteins'; Advances in experimental medicine and biology; 228: 395-435;
134. **Hirschberg CB, Snider MD;**

- ‘Topographie of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and golgi apparatus’; Ann Rev Biochem; 56: 63-87;
135. **Holbrook WP, Blackwell CC; 1989;**
 ‘Secretor status and dental caries in Iceland’; FEMS Microbiology Immunology; 47: 397-400;
 136. **Holgersson J, Strömberg N, Breimer M; 1988;**
 ‘Glykolipids of human large intestine. Difference in glykolipid expression related to anatomical localization, epithelial/non-epithelial tissue and the ABO, Le and Se phenotypes of the donor’; Biochemistry; 70: 1565-1574;
 137. **Hoogendoorn H, Piessens JP, Scholtes W, Stoddard LA; 1977;**
 ‘Hypothiocyanit ion; the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide’; Identification of the inhibiting compound; Caries Res; 11: 77-84;
 138. **Hoppenbrouwers PMM, Driessens FCM, Borggreven JMPM; 1987;**
 ‘The mineral solubility of human tooth roots’; Arch Oral Biol; 32: 319-322;
 139. **Horowitz M, Pigman W; 1978;**
 ‘The Glycoconjugates’; Academic press; New York;
 140. **Iacono VJ, Mac Kay BJ, Pollock JJ, Boldt PR, Ladenheim S, Grossbard BL, Rochon ML; 1982;**
 ‘Roles of lysozyme in the host response to periodontopathic microorganisms’; Genco RJ, Mergenhausen SE; Host-parasite interactions in periodontal disease; American Society for Microbiology; Washington, DC;
 141. **Ikebe K, Sajima H, Kobayashi S, Hata K, Morii K, Nokubi T, Ettinger RL; 2002;**
 ‘Association of salivary flow rate with oral function in a sample of community-dwelling older adults in Japan’; Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 94(2): 184-90;
 142. **Imfeld TN, Lutz F; 1980;**
 ‘Intraplaque acid formation assessed in vivo in children and young adults’; Pediat Dent; 2: 87-94;
 143. **Imfeld TN; 1983;**
 ‘Identification of low caries risk dietary components’; Karger; Basel, München;
 144. **Jancke M; 2002;**
 ‘Speichelglykane bei Adhäsionsfaktoren bei rasch fortschreitender Parodontitis’; Dissertation; Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin;
 145. **Jaup EA, Timar Peregrin A, Jodal M, Lundgren O; 1998;**
 ‘Nervous control of alkaline secretion in the duodenum as studied by the use of cholera toxin in the anaesthetized rat’; Acta physiologica Scand; 162: 2: 165-174;
 146. **Jenkins GN; 1978;**
 ‘The physiology and biochemistry of the mouth’; Blackwell; Oxford;

-
147. **Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG; 1992;**
‘Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions’; *J Dent Res*; 71: 1569-1576;
148. **Jentsch H, Sievert Y, Gocke R; 2004a;**
‘Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment’; *J Clin Periodontol*; 31(7): 511-4;
149. **Jentsch H, Beetke E, Gocke R; 2004b;**
‘Salivary analyses and caries increment over 4 years: an approach by cluster analysis’; *Clin Oral Investig*; 8(3): 156-60;
150. **Jodal M, Holmgren S, Lundgren O, Sjöqvist A; 1993;**
‘Involvement of the myenteric plexus in the cholera toxin-induced net fluid secretion in the rat small intestine’; *Gastroenterol*; 105: 1286-1293;
151. **Johansson G, Birkhed D; 1994;**
‘Effects of a long-term change from a mixed to a lactovegetarian diet on human saliva’; *Arch Oral Biol*; 47(2): 319-336;
152. **Johansson I, Ericson T; 1986;**
‘Effect of chewing on the secretion of salivary components during fasting’; *Caries Res*; 20: 141-147;
153. **Johansson I, Lenender-Lumikari M, Saellstrom AK; 1994;**
‘Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition’; *J Dent Res*; 73: 11-19;
154. **Johnson DA, Sreebny LM; 1982;**
‘Effect of increasing the bulk content of the diet on the rat parotid gland and saliva’; *J Dent Res*; 61;
155. **Jorge AO, Totti MA, de Almeida OP, Scully C; 1993;**
‘Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat’; *J Oral Pathol Med*; 22: 54-56;
156. **Judd WJ; 1980**
‘The role of lectins in blood group serology. Critical review’; *Clin Lab Sci*; 12: 171-215;
157. **Kage A; 1989;**
‘Novel competitive lectin-binding assay for quantitative characterization of glycoconjugate using different peroxidase-labeled lectins’; *J Clin Chem Clin Biochem*; 27: 701-702;
158. **Kage A, Fimmel S, Bernimoulin JP, Hägewald S, Nitschke I, Kage R, Köttgen E; 1995;**
‘Oligosaccharides in mucosal host defence: Model, method, and first data’; *Mestecky J: Advances in Mucosal Immunology*. Plenum Press; New York; 1177-1182;
159. **Kage A; 2000;**
‘Glykanseitenketten als humorale Schutzfaktoren in der Mundhöhle – Pathobiochemie und

- klinische Relevanz'; Dissertation; Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin;
160. **Kashket S, Guilmette KM, Ebersole JL; 1983;**
'The effect of prolonged stimulation of salivary flow on bacterial reactive factors'; *J Dent Res*; 62(3): 331-335;
161. **Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM; 2001;**
'Medizinische Mikrobiologie'; Thieme Verlag; Stuttgart;
162. **Kelly C, Evans P, Ma JK-C, Bergmeier LA, Taylor W, Brady LJ; 1990;**
'Sequence and characterization of the 185kDa cell surface antigen of *Streptococcus mutans*'; *Arch Oral Biol*; 35: 33S-38S;
163. **Kerr AC; 1961;**
'The physiological regulation of salivary secretions in man. A study of the response of human salivary glands to reflex stimulation'; *International Series of Monographs on Oral Biology*; Vol.1;
164. **Keyes PH; 1960;**
'The infectious and transmissible nature of experimental dental caries'; *Arch Oral Biol*; 1: 304-320;
165. **Keyes PH; 1962;**
'Recent advances in dental caries research. Bacteriology. Bacteriological findings and biological implications'; *Int Dent J*; 12: 443-464;
166. **Keyes PH; 1968;**
'Research in dental caries'; *J Am Dent Assoc*; 76: 1356-1373;
167. **Kimura Y, Ohno A, Takagi S; 1996;**
'Structural elucidation of N-linked sugar chains of storage glycoproteins in mature pea (*Pisum sativum*) seeds by ion-spray tandem mass spectrometry (IS-MS/MS)'; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 60: 1841-1850;
168. **Kintz P, Samyn N; 2002;**
'Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair'; *Ther Drug Monit*; 24(2): 239-246;
169. **Kishimoto E, Hay DI, Gibbons RJ; 1989;**
'A human salivary protein which promotes adhesion of *Streptococcus mutans* serotype c strains to hydroxyapatite'; *Infect Immun*; 57: 3702-3707;
170. **Kishimoto E, Hay DI, Gibbons RJ; 1991;**
'Inhibition of adhesion promoting activity of a human salivary protein which promotes adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to hydroxyapatite'; *FEMS Microbiol Lett*; 90: 19-22;
171. **Kishore U, Eggleton P, Reid KB; 1997;**
'Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins'; *Matrix Biology*; 15:

- 583-592;
172. **Kitawaki M, Iijima KI, Nakashizuka T, Hayakawa T; 1983;**
 'Neuraminidase activity in human crevicular fluid'; J Periodont Res; 18: 318-320;
 173. **Kjellmann O; 1970;**
 'Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus'; Odontol Revy; 21: 159;
 174. **Klein J; 1991;**
 'Immunologie'; VCH-Verlag; Weinheim; Germany;
 175. **Kocourek J, Horejsi V; 1981;**
 'Defining a lectin'; Nature; 290: 188;
 176. **Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M; 1990;**
 'Surface hydrophobicity, adherence and aggregation of cell surface protein antigen mutants of Streptococcus mutans serotype c'; Infect Immun; 58: 289-296;
 177. **Kolenbrander PE; 1988;**
 'Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque'; Annu.Rev.Microbiol; 42: 627-656;
 178. **Kondo W, Sato M, Azawa H; 1976;**
 'Haemagglutinating activity of Leptotrichia buccalis cells and their adherence to saliva coated enamel powder'; Arch oral Biol; 21: 363-369;
 179. **König KG; 1995;**
 'Caries and heredity'; Ned Tijdschr Tandheelkd; 102(1): 18-20;
 180. **König KG; 2000;**
 'Karies und Parodontopathien'; Thieme Verlag; Stuttgart; 2;
 181. **Koop HM, Valentijn-Benz M, Nieuw Amerongen AV, Roukema PA, de Graaff J; 1990;**
 'Involvement of human mucous saliva and salivary mucins in the aggregation of the oral bacteria Streptococcus sanguis, Streptococcus oralis, and Streptococcus rattus'; Antonie van Leeuwenhoek; 57: 245-252;
 182. **Kornfeld R, Kornfeld S; 1985;**
 'Assembly of asparagine-linked oligosaccharides'; Ann Rev Biochem; 54: 663-664;
 183. **Kousvelari EE, Grant SR, Baum BJ; 1983;**
 'Beta-adrenergic receptor regulation of N-linked protein glycosylation in rat parotid acinar cells'; Proc. Natl. Acad Sci USA; 80: 7146-7150;
 184. **Kousvelari EE, Grant SR, Banerjee DK, Newby MJ, Baum BJ; 1984;**
 'Cyclic AMP mediates beta-adrenergic-induced increases in N-linked protein glycosylation in rat parotid acinar cells'; Biochem J; 222: 17-24;
 185. **Kousvelari EE, Banerjee DK, Murty L, Baum BJ; 1988;**

- ‘N-linked protein glycosylation in the rat parotid gland during aging’; *Mech.Ageing Dev.*; 42: 173-181;
186. **Krasse B; 1966;**
‘Human streptococci and experimental caries in hamsters’; *Arch Oral Biol*; 11: 429-436;
187. **Kristoffersson K, Göhndahl HG, Bratthal D; 1985;**
‘The more Streptococcus mutans, the more caries on approximal surfaces’; *J Dent Res*; 64: 58-61;
188. **Kristoffersson K, Axelsson P, Birkhed D, Bratthal D; 1986;**
‘Caries prevalence, salivary Streptococcus mutans and dietary habits in 13-year-old Swedish school children’; *Comm Dent Oral Epidemiol*; 14: 202-205;
189. **Laine M, Tenovuo J, Lehtonen OP, Ojanotko-Harri A, Vilja P, Tuohimaa P; 1988;**
‘Pregnancy-related changes in human whole saliva’; *Arch Oral Biol*; in press;
190. **Lamblin G, Lhermitte M, Klein A, Houdret N, Scharfmann A, Ramphal R, Roussel P; 1991;**
‘The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa’; *Am Rev Respir Dis*; 144: 19-24;
191. **Lamont RJ, Rosan B; 1990;**
‘Adherence of mutans streptococcus to other oral bacteria’; *Infect Immun*; 58: 1738-1743;
192. **Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, Malamud D, Rosan B; 1991;**
‘Salivary agglutinin mediated adherence of Streptococcus mutans to early plaque bacteria’; *Infect Immun*; 59: 3446-3450;
193. **Lang NP; 2003;**
‘Parodontalerkrankungen – Klassifikation und Charakterisierung’; Quintessenz Bibliothek;
194. **Lashley KS; 1916;**
‘Reflex secretion of the human parotid gland’; *J exp Psychol*; 1: 461;
195. **Lautenbach E; 1992;**
‘Wörterbuch Zahnmedizin’; Verlag für Zahnmedizin; Hanau;
196. **Lee SF, Progulsk-Fox A, Erdos GW, Piacentini DA, Ayakawa GY, Crowley PJ; 1989;**
‘Construction and characterization of isogenic mutants of Streptococcus mutans deficient in major surface protein antigen P1 (Agl/II)’; *Infect Immun*; 57: 3306-3313;
197. **Leous P, Belasova L; 1995;**
‘Spinnbarkeit of saliva in young people with different prevalence of dental caries’; *Eur J Oral Sci*; 103: S34;
198. **Levine MJ, Herzberg MC, Levine MS, Ellison SA, Stinson MW, Li HC, van Dyke T; 1978;**
‘Specificity of salivary bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with Streptococcus sanguis and Streptococcus mutans’; *Infect Immun*; 19: 107-115;

-
199. **Levine MJ, Tabak A, Reddy M, Mandel ID; 1985;**
‘Nature of salivary pellicles in microbial adherence. Role of salivary mucins’; Mergenhagen SE, Rosan B; Molecular basis of oral microbiol adhesion; American Society for Microbiology; Washington;
200. **Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW, Al-Hashimi I; 1987;**
‘Structural aspects of salivary glycoproteins’; J Dent Res; 66: 436-441;
201. **Levine WS, Greenblatt IM; 1996;**
‘Lost in the pocket: the current status of periodontal diagnosis’; Technol Health Care; 4: 317-322;
202. **Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG; 2004;**
‘Identification of the in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses’; J Dent Res; 83(1): 60-64;
203. **Lié MA, Myint MM, Schenck K, Timmermann MF, van der Velden U, van der Weijden GA, Loos BG; 2002;**
‘Parotid salivary S-IgA antibodies during experimental gingivitis in smokers and non-smokers’; J Periodontal Res; 37(2): 86-92;
204. **Liewellyn-Smith IJ; 1987;**
‘Neuropeptides and the microcircuitry of the enteric nervous system’; Experimentia; 43: 813-821;
205. **Ligtenberg AJ, Veerman ECI, De Graaff J, Nieuw Amerongen AV; 1990b;**
‘Saliva induced aggregation of oral streptococci and the influence of blood group reactive substances’; Arch Oral Biol; 35: 141S-143S;
202. **Liljemark WF, Schauer SV; 1975;**
‘Studies on the bacterial components which bind Streptococcus sanguis and Streptococcus mutans to hydroxyapatite’; Arch Oral Biol; 20: 609-615;
203. **Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG; 1986;**
‘In vivo colonization of salivary pellicle by Haemophilus, Actinomyces, and Streptococcus species’; Caries Res; 20: 481-497;
204. **Lis H, Sharon N; 1986;**
‘Lectins as molecules and as tools’; Annu.Rev.Biochem; 55: 35-67;
205. **Listgarten MA; 1976;**
‘Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man’; J Periodontol; 47: 1-18;
206. **Loe H, Theilade E, Jensen SB; 1965;**
‘Experimental gingivitis in man’; J Periodontology; 36: 177-187;

207. **Loesche WJ; 1982;**
 'Dental caries: A treatable infection'; The University of Michigan School of Dentistry;
208. **Loesche WJ; 1986;**
 'Role of Streptococcus mutans in human dental decay'; Microb Rev; 50: 353-380;
209. **Losso EM, Singer JM, Nicolau J; 1997;**
 'Effect of gustatory stimulation on flow rate and protein content of human parotid saliva according to the side of preferential mastication'; Arch Oral Biol; 42(1): 83-87;
210. **Lund B, Marklund BI, Stromberg N, Lindberg F, Karlsson KA, Normark S; 1988;**
 'Uropathogenic Escherichia coli can express serologically identical pili of different receptor binding specificities'; Mol Microbiol; 2: 255-263;
211. **Lundgren O, Svanborg Edén C, Jodal M; 1988;**
 'Mucosal nerves and immunological function'; Monogr Allergy; 24: 104-117;
212. **Madison KC; 2003;**
 'Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis'; J Invest Dermatol; 121(2): 231-241;
213. **Malamud D, Tabak L; 1993;**
 'Saliva as a diagnostic fluid'; Annals of the N.Y.Academy of Science; 694;
214. **Mandel ID; 1987;**
 'The function of saliva'; J Dent Res; 66: 623-627;
215. **Mandel ID; 1989;**
 'The role of saliva in maintaining oral homeostasis'; J Am Dent Assoc; 119: 298-304;
216. **Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK, Petro TM; 1994;**
 'Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis'; J Periodontol; 65: 807-813;
217. **Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F, Baldone DC, Pruitt KM, Hjerpe A; 1988;**
 'Purification and characterization of human salivary peroxidase'; Biochemistry; 27: 233-239;
218. **Marsh PD; 2004;**
 'Dental plaque as a microbial biofilm'; Caries Res; 38(3): 204-11;
219. **Marthaler T; 1988;**
 'Clinical cariostatic effects of various fluoride methods and programs'; Eksstrand J, Fejerskov O, Silverstone L; Fluoride in dentistry; Munksgaard; Kopenhagen; 252-275;
220. **Mason DK, Chisholm DM; 1975;**
 'Salivary Glands in Health and Disease'; WB Saunders; Philadelphia;
221. **Mayhall CW; 1970;**
 'Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth'; Arch Oral Biol; 15: 1327-1341;

-
222. **Mc Bride BC, Gisslow MT; 1977;**
‘Role of sialic acid in saliva induced aggregation of *Streptococcus sanguis*’; *Infect Immun*; 18: 35-40;
223. **Meckel AH; 1965;**
‘The formation and properties of organic films on teeth’; *Arch Oral Biol*; 10: 585-597;
224. **Melo NS, Nimtze M, Conradt HS, Fevereiro PS, Costa J; 1997;**
‘Identification of the human Lewis(a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.)’; *FEBS Letters*; 415: 186-191;
225. **Melvin JE; 1991;**
‘Saliva and dental diseases’; *Curr Opin Dent*; 1: 795-801;
226. **Mergenhagen SE, Sandberg AL, Chassy BM, Brennan MJ, Yeung MK, Donkersloot JA, Cisar JO; 1987;**
‘Molecular basis of bacterial adhesion in the oral cavity’; *Rev. Infect Dis* 9 *Suppl* 5: S457-S474;
227. **Mestecky J, McGhee JR, Arnold RR, Michalek SM, Prince SJ, Babb JL; 1978;**
‘Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen’; *J Clin Invest*; 61: 731-737;
228. **Mestecky J; 1987;**
‘The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions’; *J Clin Immunol*; 7: 265-276;
229. **Miller WD; 1892;**
‘Die Mikroorganismen der Mundhöhle’; G Thieme, Leipzig;
230. **Mirth DB, Miller CJ, Kingman A, Bowen WH; 1979;**
‘Inhibition of saliva-induced aggregation of *Streptococcus mutans* by wheat germ agglutinin’; *Caries Res*; 13: 121-131;
231. **Mirth DB, Miller CJ, Kingman A, Bowen WH; 1981;**
‘Binding of salivary aggregation factors for *Streptococcus mutans* by concanavalin A and fucose-binding protein’; *Caries Res*; 15: 1-8;
232. **Montgomery R, Conway TW, Spector AA; 1990;**
‘Biochemistry. A case-oriented approach’; The C.V. Mosby Company; St.Louis; Missouri; 314-322;
233. **Montieul J; 1984;**
‘Spatial conformation of glycans and glycoproteins’; *Biol Cell*; 51: 115-131;
234. **Moore WE; Moore LV; 1994;**
‘The bacteria of periodontal disease’; *Periodontology* 2000; 5: 66-77;
235. **Mühlemann HR, Son S; 1971;**
‘Gingival sulcus bleeding - a leading symptom in initial gingivitis’; *Helvetica Odontologia Acta.*;

- 15(2): 107-113;
236. **Mullally BH; Dace B; Shelburne CE; Wolff LF; Coulter WA; 2000;**
 'Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early onset periodontitis'; J Periodont Res; 35: 232-241;
 237. **Münzel M; 1976;**
 'Die Biochemie der menschlichen Speicheldrüsensekrete'; Arch. Oto-Rhino-Laryng; 213: 209 – 285;
 238. **Murray PA, Levine MJ, Tabak A, Reddy MS; 1982;**
 'Specificity of salivary-bacterial interactions II.Evidence for a lectin on Streptococcus sanguis with specificity for a NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc sequence'; Biochem Biophys Res Commun; 106: 390-396;
 239. **Murray PA, Levine MJ, Tabak A, Reddy MS; 1984;**
 'Neuraminidase activity: A biochemical marker to distinguish Streptococcus mitis from Streptococcus sanguis'; J Dent Res; 63: 111-113;
 240. **Muster T, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Trikola A, Schulz P, Grassauer A, Engehardt OG, Garcia S, Palese P; 1995;**
 'Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus'; J Virol; 69: 6678-6686;
 241. **Nagata K, Shibata S, Inoshita E, Tamagawa H, Shizukuishi S, Tsunemitsu A; 1982;**
 'The effect of daily mouth rinsing with galactose on dental plaque formation'; J Dent Health; 32: 104-107;
 242. **Nagata K, Nkao M, Shibata S, Shizukuishi S, Nakamura R, Tsunemitsu A; 1983;**
 'Purification and characterization o galactosephilic component present on the cell surfaces of Streptococcus sanguis ATCC 10557'; J Periodontol; 54: 163-172;
 243. **Narhi TO; 1994;**
 'Prevalence of subjective feelings of dry mouth in the elderly'; J Dent Res; 73: 20-25;
 244. **Navazesh M, Christensen CM; 1982;**
 'A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures'; J Dent Res; 61: 1158-1162;
 245. **Navazesh M, Christensen CM, Brightman V; 1992;**
 'Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction'; J Dent Res; 71: 1363-1369;
 246. **Navazesh M; 1993;**
 'Methods for collecting saliva'; Ann.N.Y.Acad.Sci.; 694: 72-77;
 247. **Nederfors T, Dahlof C; 1993;**
 'A modified device for collection and flow-rate measurment of submandibular-sublingual saliva'; Scand J Res; 101(4): 210-214;

-
248. **Neeser JR, Grefström RC, Woltz A, Brassart D, Fryder V, Guggenheim B; 1995;**
‘A 23 kDa membrane glycoprotein bearing NeuNAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc O-linked carbohydrate chains acts as a receptor for *Streptococcus sanguis* OMZ 9 on human buccal epithelial cells’;
Glycobiol; 5: 97-104;
249. **Neiders ME, Chen PB, Suido H, et al; 1989;**
‘Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*’; *J Periodont Res*; 24: 192-198;
250. **Newbrun E; 1982;**
‘Sugar and dental caries: A review of human studies’; *Science*; 217: 418-423;
251. **Nikiforuk G; 1985;**
‘Understanding dental caries. Vol.1. Etiology and mechanisms. Basic and clinical aspects’;
Karger, Basel;
252. **Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB); 1981;**
‘IUB - IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JBCN) Newsletter’; *Arch Biochem Biophys*; 206: 458-462;
253. **Nyvad B, Fejerskov O; 1986;**
‘Formation, composition and ultrastructure of microbial deposits on the tooth surface’;
Thylstrup A, Fejerskov B; *Textbook of cariology*; Munksgaard; Copenhagen; 56-73;
254. **Ofek I, Mirelman D, Sharon N; 1977;**
‘Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors’; *Nature*; 265: 623-625;
255. **Ofek I, Perry A; 1985;**
‘Molecular basis of bacterial adherence to tissues’; Mergenhagen SE, Rosan B; *Molecular basis of oral microbial adhesion*; Am Soc Microbiol; Washington DC; 7-13;
256. **Ofek I, Sharon N; 1990;**
‘Adhesions as lectins: specificity and role in infection’; *Curr. Top. Microbiol Immunol*; 151: 91-113;
257. **Ofek I, Hasty DL, Sharon N; 2003;**
‘Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems’; *FEMS Immunol Med Microbiol*; 38(3): 181-91;
258. **Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T; 1989;**
‘Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*’; *Molec Microbiol*; 3: 221-228;
259. **Olsson J, Carlen A, Holmberg K; 1991;**
‘Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to hydroxyapatite with combinations of alkyl phosphates and nonionic surfactants’; *Caries Res*; 25: 51-57;

260. **Ooshima T, Hashida T, Fuchihata H, Fujiwara T, Yoshida T, Izumitani A; 1990;**
 'Effect of experimental hyposalivation on the induction of dental caries in rats infected with *Streptococcus mutans*'; *Caries Res*; 24: 446-451;
261. **Örstavik D, Kraus FW; 1974;**
 'The acquired pellicle: Enzyme and antibody activities'; *Scand J Dent*; 82: 202-205;
262. **Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD; 1954;**
 'Use of germfree animal technic in the study of experimental dental caries'; *J Dent Res*; 33: 147-174;
263. **Orland FJ, Blayney RJ, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagne M; 1954;**
 'Experimental caries in germ-free rats inoculated with enterococci'; *J Am Dent Assoc*; 50: 259-272;
264. **Osterberg T, Birkhed D, Johansson C, Sanborg A; 1992;**
 'Longitudinal study of stimulated whole saliva in an elderly population'; *Scand J Dent Res*; 100: 340-345;
265. **Perch B, Kjems E, Ravn T; 1974;**
 'Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources'; *Acta Pathol Scand*; 82: 357-370;
266. **Pedersen W, Schubert M, Izutsu K, Mersai T, Truelove E; 1985;**
 'Age-dependant decrease in human submandibular gland flow rates as measured under resting and post-stimulation conditions'; *J Dent Res*; 64(5): 822-825;
267. **Phillips CL, Tandler B, Nagato T; 1993;**
 'Evolutionary divergence of salivary gland acinar cells: a format for understanding molecular evolution'; Dobrosielski-Vergona K; *Biology of salivary glands*; CRC Press; London; 39-80;
268. **Pickerill HP; 1919;**
 'The prevention of dental caries and oral sepsis'; Paul B Hoeber Inc, New York; 2nd ed.;
269. **Pinkstaff CA; 1993;**
 'Cytology, Histology, and histochemistry of salivary glands'; Dobrosielski-Vergona K; *Biology of salivary glands*; CRC Press; London; 15-38;
270. **Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelle A, Nyman SR, Lang NP; 1994;**
 'Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans'; *Clin Oral Implants*; 5(4): 254-259;
271. **Prakobphol A, Leffler H, Fisher SJ; 1993;**
 'The high-molecular weight human mucin is the primary salivary carrier of ABH, Le(a), and Le(b) blood group antigens'; *Crit Rev Oral Biol Med*; 4: 325-333;

-
272. **Procter GB; 1998;**
‘Secretory Protein Synthesis and Constitutive (Vesicular) Secretion by Salivary Glands’; Garrett JR, Ekström J, Anderson LC; Glandular Mechanisms of Salivary Secretions; Karger; Schweiz; Vol.10: 73-88;
273. **Pruit KM; 1977;**
‘Macromolecular components of oral fluids at tooth surfaces’; Swed Dent J; 1: 225-240;
274. **Pruitt KM, Adamson M; 1977;**
‘Enzyme activity of salivary lactoperoxidase adsorbed to human enamel’; Infect Immun; 17: 112-116;
275. **Quigley G, Hein J; 1962;**
‘Comparative cleansing efficiency of manual power brushing’; J Am Dent Assoc; 65: 26-29;
276. **Quirynen M, BollenCML; 1995;**
‘The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man’; J Clin Periodontal; 22: 1-14;
277. **Raedler A; Raedler E; 1985;**
‘The use of lectins to study normal differentiation and malignant transformation’ J. Cancer Res. Clin. Onkology; 109: 245 – 251;
278. **Rateitschak KH; Rateitschak EM; Wolf HF; 2004;**
‘Farbatlas der Zahnmedizin 1: Parodontologie’; Thieme Verlag; Stuttgart; 3rd ed.;
279. **Renggli HH, Mühlemann HR, Rateitschak KH; 1984;**
‘Parodontology’; Thieme Verlag; Stuttgart;
280. **Rittman BR, Mackenzie IC, Rittman GA; 1982;**
‘Lectin binding to murine oral mucosa and skin’; Arch Oral Biol; 27: 1013-1019;
281. **Rohen JW; 1997;**
‘Anatomie für Zahnmediziner’; Schattauer Verlag; 3rd ed.;
282. **Roitt IM, Lehner T; 1983;**
‘Immunology of oral diseases’; Blackwell Scientific Publications; Oxford; 2nd ed.;
283. **Roitt I, Brostoff J, Male D; 1985;**
‘Immunology’; Gower Medical Publishing; London;
284. **Rölla G, Eggen KE, Ciardi JE, Bowen WH; 1982;**
J Dent Res; 63: 207, abstr.796;
285. **Russel AL; 1963;**
‘International nutrition surveys: A summery of preliminary dental findings’; J Dent Res; 42: 233-244;
286. **Russel MW; 1979;**
‘Purification and properties of a protein surface antigen of Streptococcus mutans’; Microbios;

- 25: 7-18;
287. **Ryberg M, Johannsson I, Ericson T, Mörnstad H, Hendriksson R, Jönsson G and Sundström S; 1989;**
 'Effects of chronic stimulation of salivary gland β -adrenoceptors on saliva composition and caries development in the rat'; J Oral Pathol Med; 18: 529 – 532;
 288. **Salonen L, Allander L, Brattahl D, Togelius J, Hellden L; 1989;**
 'Oral health status in an adult Swedish population. Prevalence of caries'; Swed Dent J; 13: 111-123;
 289. **Sato C, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y; 1998;**
 'Identification of oligo-N-glycolylneuraminic acid residues in mammal-derived glycoproteins by a newly developed immunochemical reagent and biochemical methods'; J Biol. Chem.; 273: 2575-2582;
 290. **Scannapieco FA, Levine MJ; 1990;**
 'Saliva and dental pellicles'; Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW; Contemporary Periodontics; Mosby; St.Louis;
 291. **Scheie AA, Eggen HK, Röllä G; 1987;**
 'Glykosyltransferase activity in human in vivo formed enamel pellicle and in whole saliva'; Scand J Dent Res; 95: 212-215;
 292. **Schenck K, Poppelsdorf D, Denis C, Tollefsen T; 1993;**
 'Levels of salivary IgA antibodies reactive with bacteria from dental plaque are associated with susceptibility to experimental gingivitis'; J Clin Periodontol.;20(6): 411-417;
 293. **Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K; 1997;**
 'Anatomie'; Springer-Verlag; Berlin-Heidelberg-New York;
 294. **Schiff JM, Fisher MM, Underdown BJ; 1986;**
 'Secretory component as the mucosal transport receptor; separation of physicochemically analogous human IgA fractions with different receptor-binding capacities'; Mol Immunol; 23: 45-56;
 295. **Schlegel HG; 1999;**
 'Geschichte der Mikrobiologie'; Leopoldiner; Halle;
 296. **Schlesinger DH, Hay DI, Levine MJ; 1989;**
 'Complect primary structure of statherin, a protein inhibitor of calcium phosphate precipitation, from the saliva of the monkey, Macaca arctoides'; Int J Pept Protein Res; 34: 374-380;
 297. **Schluger S, Yuodelis R, Page RC, Johnson RH; 1990;**
 'Periodontal Diseases'; Lea & Febiger; Philadelphia;
 298. **Schmidt-Westhausen AM; 2000;**
 'Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese und Therapie der oralen Candidiasis bei

- Immundefizienz'; Habilitationsschrift; Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin;
299. **Schneyer LH; 1955;**
'Method for the collection of separate submaxillary and sublingual salivas in man'; J Dent Res; 34: 257 – 261;
300. **Schroeder HE; 1996;**
'Pathologie oraler Strukturen: Zähne, Pulpa, Parodont'; Karger; Basel; 3rd ed.;
301. **Seemann R, Zimmer S, Bizhang M, Kage A; 2001;**
'Differences in the salivary glycan pattern between children with high and low caries susceptibility'; Caries Res; 35: 2: 156-161;
302. **Seemann R; 1996;**
'Antiadhäsive Speichelfaktoren und Kariesbefall zehnjähriger Kinder'; Dissertation; Charité – Universitätsmedizin Berlin; Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin;
303. **Seifert G, Miehke A, Haubrich J, Chilla R; 1984;**
'Histologie und Ultrastruktur der Speicheldrüsen, Speicheldrüsenkrankheiten'; Thieme; Stuttgart; 8-24;
304. **Shannon IL, Suddick RP, Edmonds EJ; 1973**
'Effect of rate of gland function on parotid saliva fluoride concentration in the human'; Caries Res; 7(1): 1-10;
305. **Shannon IL, Frome WJ; 1973;**
'Enhancement of salivary flow rate and buffering capacity'; J Can Dent Assoc; 39(3): 177-181;
306. **Sharon N; 1987;**
'Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease'; FEBS Lett; 217: 145-157;
307. **Sharon N, Lis H; 2004;**
'History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules'; Glycobiology; 14(11): 53R-62R;
308. **Sheiham A; 1983;**
'Sugars and dental caries'; Lancet; Feb 5: 282-284;
309. **Shibata S, Nagata K, Nakamura K, Tsunemitsu A, Misaki A; 1980;**
'Interaction of parotid saliva basic glykoprotein with streptococcus sanguis ATCC 10557'; J Periodontal; 51: 499-504;
310. **Shklair IL, Keene HJ; 1974;**
'A biological scheme for seperation of the five varieties of Streptococcus mutans'; Arch Oral Biol; 19: 1079-1081;
311. **Silbernagel S, Despopoulus A; 2003;**
'Taschenatlas der Physiologie'; Thieme Verlag; Stuttgart; 6th ed.;

312. **Slomiany BL, Murty VLN, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdzinski K, Mandel ID; 1986;**
 'Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man'; *Arch Oral Biol*; 31: 187-191;
313. **Smith DJ, King WF, Barnes LA, Trantolo D, Wise DL, Taubman MA; 2001;**
 'Facilitated intranasal induction of mucosal and systemic immunity to mutans streptococcal glucosyltransferase peptide vaccines'; *Infect Immun*; 69: 8: 4767-4773;
314. **Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J; 1977;**
 'Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque'; *J Periodont Res*; 12: 90-106;
315. **Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD; 1988;**
 'Association between microbial species in subgingival plaque samples'; *Oral Microbiol Immunol*; 3: 1;
316. **Söderling E; 1989;**
 'Practical Aspects of Salivary Analyses'; Tenovuo JO; Human saliva: Clinical chemistry and microbiology; Vol.1; CRC Press; Florida; USA; 1-24;
317. **Someya M, Sakata K, Nagkura H, Oouchi A, Hareyama M; 2003;**
 'The changes in irradiated salivary gland function of patients with head and neck tumors treated with radiotherapy'; *Jpn J Clin Oncol*; 33(7): 336-340;
318. **Sönju T, Christensen TB, Kornstad L, Rölla G; 1974;**
 'Electron microscopy, carbohydrate analysis and biological activities of the proteins adsorbed in two hours on the tooth surfaces in vivo'; *Caries Res*; 8: 113-122;
319. **Sönju T; Glantz PO; 1975;**
 'Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics'; *Arch Oral Biol*; 20: 687-681;
320. **Sreebny IM; 1996;**
 'Xerostomia: diagnosis, management and clinical complications'; Edgar WM & O'Mullane DM; Saliva and oral health; *Brit Dent J*; London; Great Britain; 2: 43-66;
321. **Staat RH, Peyton IC; 1984;**
 'Adherence of oral streptococci: Evidence of nonspecific adsorptions to saliva-coated hydroxyapatite surfaces'; *Infect Immun*; 44: 653-659;
322. **Steinberg D, Kopec LK, Bowen WH; 1993;**
 'Adhesion of Actinomyces isolates to experimental pellicle'; *J Dent Res*; 72: 1015-1020;
323. **Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI; 2004**
 'Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm'; *J Antimicrob Chemother*; 54(1): 86-9;
324. **Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Kallestal C, Stromberg N; 2001;**
 'The association of bacterial adhesion with dental caries'; *J Dent Res*; 80(11): 2005-2010;

-
325. **Stephan RM; 1966;**
‘Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals’; J Dent Res; 45: 1551-1561;
326. **Stephen KW, Lamb AB, McCrossan J; 1978;**
‘A modified appliance for the collection of human submandibular and sublingual salivas’; Arch oral Biol; 23: 835 – 837;
327. **Stinson MW, Levine MJ, Cavese JM, Prakobphol A, Murray PA, Tabak LA, Reddy MA; 1982;**
‘Adherence of Streptococcus sanguis to salivary mucin, bound to glass’; J Dent Res; 61: 1390-1393;
328. **Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL; 2003;**
‘Biochemie’; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford; 5th ed.;
329. **Suber JF, Boackle RJ, Javed T, Vesely J; 1984;**
‘Parotid saliva agglutinins for sheep erythrocytes as a measure of ongoing inflammation in periodontal disease’; J Periodontol; 55 (9): 512 – 515;
330. **Sugiyama E, Baehni P, Cimasoni G; 1992;**
‘An in vitro study of polymorphonuclear leucocyte-mediated injury to human gingival keratinocytes by periodontopathic bacterial extracts’; Arch Oral Biol; 37: 1007-1012;
331. **Swift R; 2003;**
‘Direct measurement of alcohol and its metabolites’; Addiction, 98 suppl 2: 73-80;
332. **Tabac LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA; 1982;**
‘Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity’; J Oral Pathol; 11: 1-17;
333. **Taichman NS, Bohringer HR, Lai CH, Shenker BJ, Tsai CC, Berthold PH, Listgarten MA, Shapiro IS; 1982;**
‘Pathobiology of oral spirochetes in periodontal disease’; J Periodont Res; 17: 449-451;
334. **Tammiala Salonen T, Söderling E; 1993;**
‘Protein composition, adhesion, and agglutination properties of saliva in burning mouth syndrom’; Scand J Dent Res; 101: 215-218;
335. **Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T; 2003;**
‘Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis’; J Oral Pathol Med.; 32(10): 586-594;
336. **Ten Cate AR; 1989;**
‘Salivary glands. Oral histology development, structure and function’; 3rd ed.; 312-340;
337. **Tenovuo J; 1989;**
‘Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology’; CRC Press Inc.; Florida; Vol.1;
338. **Tenovuo J; Lagerlöf F; 1994;**

- Thylstrup A, Fejerskov O; Textbook of clinical cariology; Copenhagen; Munksgaard; 2nd ed.; 17-34;
339. **Theilade E, Theilade J; 1970;**
‘Bacteriological and ultrastructural studies of developing dental plaque’; Mc Hugh WD; Dental Plaque; Livingstone, Edingburgh;
340. **Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L; 1982;**
‘Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and mylar strips in humans’; J Periodont Res; 17: 12-25;
341. **Theilade J; 1970;**
‘Dental plaque and dental calculus’; Lindhe J; Textbook of Clinical Periodontology; Munksgaard; Kopenhagen;
342. **Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM; 1994;**
‘Antibacterial activity of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci’; Infect Immun; 62: 529-535;
343. **Timar Peregrin A; Svensson M, Ahlman H, Jodal M, Lundgren O; 1999;**
‘The effects on net fluid transport of noxious stimulation of jejunal mucosa in anaesthetized rats’; Acta physiologica Scandinavica; 166: 1: 55-64;
344. **Tolson ND; Daley TD, Wysocki GP; 1985;**
‘Lektin probes of glycoconjugates in human salivary glands:1’; Journal of Oral Pathology; 14: 523-530;
345. **Tomasi TB, Bienenstock J; 1968;**
‘Secretory Immunglobulins’; Adv Immunol; 9: 1-96;
346. **Truelove EL; Bixler D; Merritt D; 1967;**
‘Simplified method for collection of pure submandibular saliva in large volumes’; J Dent Res; 46(6): 1400–1402;
347. **Uhlenbruck G, Gross R, Koch OM, Lee CK; 1983;**
‘Die Bedeutung von Lektinen für den Adhäsionsmechanismus von Bakterien’; Dtsch Ärzteblatt; 80(5): 27-32;
348. **Uhlenbruck G; Klein PJ; 1984;**
‘Die praktische Bedeutung von Lektinen’; Sonderdruck Deutsches Ärzteblatt - Ärztliche Mitteilungen; 4: 1-2;
349. **van der Velden U, Abbas F, Hart AA; 1985;**
‘Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. (I.) Clinical observations’; J Clin Periodontol; 12(1): 61-68;
350. **van Gils PC, Brand HS, Timmermann MF, Veermann EC, van der Velden U, van der Weijden GA; 2003;**

- ‘Salivary cystatin activity and cystatin C in experimental gingivitis in non-smokers’; *J Clin Periodontol*; 30(10): 882-886;
351. **van Hout J, Gibbons RJ, Banghart S; 1970;**
‘Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the tooth surface’; *Arch Oral Biol*; 15: 1025;
352. **van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJB; 1989;**
‘Bacterial adhesion: A physicochemical approach’; *Microbial Ecology*; 17: 1-15;
353. **van Nieuw Amerongen A, Oderkerk CH, Driessen AA; 1987;**
‘Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro’; *Caries Res*; 21: 297-309;
354. **van Nieuw Amerongen A, Oderkerk CH, Driessen AA; 1987;**
‘Role of mucins from human saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro’; *Caries Res*; 21: 297-309;
355. **van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC; 2004;**
‘Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?’; *Caries Res*; 38(3): 247-53;
356. **van Winkelhoff AJ; De Groot P; Abbas F; De Graaff J; 1994;**
‘Quantitative aspects of the subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a patient with localized juvenile periodontitis’; *J Clin Periodontol*; 21: 199-202;
357. **Wang SL, Zhao ZT, Li J, Zhu XZ, Dong H, Zhang YG; 1998;**
‘Investigation of the clinical value of total saliva flow rates’; *Arch Oral Biol*; 43(1): 39-43;
358. **Weatherell JA, Strong M, Robinson C, Ralph JP; 1986;**
‘Fluoride distribution in the mouth after fluoride rinsing’; *Caries Res*; 20: 111-119;
359. **Weinberg ED; 2003;**
‘The therapeutic potential of lactoferrin’; *Expert Opin Investig Drugs*; 12(5): 841-51;
360. **Weiss EL, Lev-Dor R, Sharon N, Ofek I; 2002;**
‘Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria’; *Crit Rev Food Sci Nutr*; 42(3 Suppl): 285-92;
361. **Weiss EI, Kozlovsky A, Steinberg D, Lev-Dor R, Bar Ness Greenstein R, Feldman M, Sharon N, Ofek I.; 2004**
‘A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite’; *FEMS Microbiol Lett*; 232(1): 89-92;
362. **Whelton H; 1996;**
‘Introduction: The Anatomy and Physiology of Salivary Glands’; Edgar WM, O’Mullane DM; *Saliva and oral health*; *Brit Dent J*; London; Great Britain; 2nd ed.; 1-8;
363. **Whiley RA, Hardie JM, Russel RRB, Beighton D; 1988;**
‘*Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus mutans*

- serotype h'; *Int J Syst Bacteriol*; 38: 25;
364. **Wolf RO; 1964;**
'Regulated vacuum system for collecting submaxillary and sublingual saliva'; *J Dent Res*; 43: 303;
365. **Wolff A, Begleiter A, Moskona D; 1997;**
'A novel system of human submandibular / sublingual saliva collection'; *J Dent Res*; 76(11): 1782-1786;
366. **Wolff L, Dahlèn G, Aeppli D; 1994;**
'Bacteria as risk markers for periodontitis'; *J Periodontol*; 64: 498-510;
367. **Wu AM, Sugii S, Herp A; 1988;**
'A table of lectin carbohydrate specificities'; *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*; Vol.6.; Sigma Chemical Company; St. Louis; Missouri; USA;
368. **Yokoyama M, Stegmaies A, Gilbert FI, Fukunaga FH, Paik YK; 1965;**
'Studies of blood groups, immunoglobulins and isoagglutinins in multiple myeloma and various hematological disorders in the Honolulu area'; *Hawaii Med J*; 25: 106-111;
369. **Younson J, Kelly C; 2004;**
'The rational design of an anti-caries peptide against *Streptococcus mutans*'; *Mol Divers*; 8(2): 121-126;
370. **Zambon JJ; Christersson LA; Slots J; 1983;**
'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families'; *J Periodontol*; 54: 707-711;
371. **Zero DT; 2004;**
'Sugars - the arch criminal?'; *Caries Res*; 38(3): 277-285;
372. **Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J; 2001;**
'Experimental peri-implant mucositis in man'; *J Clin Periodontol*; 28(6): 517-523;

8 Anhang

8.1 Materialien zur klinischen Untersuchung

- Befundungssoftware Prolax® (prophy-Ware-GmbH, Leer)
- zahnärztliche Behandlungseinheit Siro 1 s (Siemens AG, Stuttgart)
- planer oberflächenverspiegelter Mundspiegel (Größe 5, Aesculap, Tutlingen)
- zahnärztliche Pinzette (Aesculap, Tutlingen)
- Parodontalsonde PCP 10 (Hu-Friedy Europe, B.Quétin GmbH, Leimen)
- gerade zahnärztliche Sonde (Aesculap, Tutlingen)
- Apparatur zur Speichelgewinnung (Jancke, 2002)
- Sterilium (Bode Chemie, Hamburg)
- Speisewürze aus Zitronensaft 2%ig (Sizilia Citrussäfte GmbH & Co Deutschland, Berlin))
- Reagenzröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Trockeneis
- Satorius Analysewaage (Satorius GmbH, Göttingen)
- Eppendorf Zentrifuge 5415c (Eppendorf, Berlin)
- Eppendorf Pipette (Eppendorf, Berlin)

8.2 Computer und zugehörige Software

- Pentium(R) 4 CPU 2.00GHz 256 MB RAM
- Windows XP
- Word 2000
- Photo Draw 2000
- SPSS für Windows 10.0

8.3 Labormaterialien

- 96-well Mikrotiterplatte (Nunc GmbH Deutschland, Wiesbaden)
- Eppendorf Pipette (Eppendorf, Berlin)
- Multikanalpipette (Socorex, Swiss)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Eppendorf Zentrifuge 5410 (Eppendorf, Berlin)
- Minishaker IKA MS 2 (IKA Labortechnik, Staufen i.Br.)

- ### 8.3.1 Puffer

Phosphat-Puffer (PBS) für Beschichtungen:	1,2 g	+ 8,22 g Na_2HPO_4 / l
	KH_2SO_4	(= PBS), pH = 7,6

8.3.2 Lektine

Biotinylierte pflanzliche Lektine (Sigma Biochemica, Deisenhofen & Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

Die jeweilige Bindungsspezifität, die Verdünnung, die zur Beschichtung verwendeten Glykokonjugate und Standards sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

8.3.3 Beschichtungen, Standard und Kontrolle

Beschichtungen:

- BSA-Galaktose-1,3-N-Acetyl-Galaktosamin (Janssen Biochemica, Beerse, Belgien)
- Alle übrigen Beschichtungen (siehe Tabelle 7) wurden über die Firma „Sigma Biochemica, Deisenhofen“ bezogen.

Standard:

- N-Acetyl-saures-Glykoprotein (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- Muzinpräparation
- Alle übrigen für den Standard verwendeten Zucker (siehe Tabelle 7) wurden über die FIRMA „Sigma Biochemica, Deisenhofen“ bezogen.

Kontrolle:

- Die bei einem 30 ml Ansatz verwendeten Zucker der Kontrolle sind in Tabelle 8 aufgelistet.

8.3.4 Färbung

Tetramethylbenzidin (TMB) – Färbepuffer:

1% TMB-Lösung in Gallati-Puffer:

- TMB-Lösung: 240 mg TMB (Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz)
+ 5 ml DMSO (= Dimethyl-Sulfon-Oxid)
+ 5 ml Ethanol
- Gallati-Puffer: 8,4 g Zitronensäure-Monohydrat auf 160 ml Aqua dest. mit 4N KOH auf pH-Wert 3,95 einstellen und auf 200 ml mit Aqua dest auffüllen. Zur Fertigstellung 68 µl 30%iges H₂O₂ dazugeben. (-in dunkler Flasche ca. 3 Wochen im Kühlschrank lagerbar-)
- Streptavidin gekoppelt mit Peroxidase als sekundäres Konjugat (Calbiochem Corporation, La Jolla, USA)

8.4 Abkürzungen

A. - - - - -	Actinobacillus
Aa - - - - -	Actinobacillus actinomycetemcomitans
AAA - - - - -	Anguilla anguille Agglutinin
AP - - - - -	Erwachsenenparodontitis
BSA - - - - -	Bovines Serum Albumin
bzw. - - - - -	beziehungsweise
ca. - - - - -	circa
ConA - - - - -	Concanavalin A
d.h. - - - - -	das heißt
E. - - - - -	Escherichia
EDTA - - - - -	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA - - - - -	‘enzyme linked immunosorbent assay’
EPS - - - - -	Extrazelluläre Polysaccharide
ER - - - - -	Endoplasmatisches Retikulum
etc. - - - - -	et cetera
et al. - - - - -	‘et alii’ = und andere
Fuc - - - - -	Fukose
Gal - - - - -	Galaktose
GalNac - - - - -	N-Acetyl-Galaktosamin
GlcNac - - - - -	N-Acetyl-Glucosamin
Gll. - - - - -	Glandulae
GNA - - - - -	Galanthus nivalis Agglutinin
GS 1 - - - - -	Griffonia simplicifolia
Ig - - - - -	Immunglobulin
inkl. - - - - -	inklusive
JP - - - - -	Juvenile Parodontitis
Kontr. - - - - -	Kontrolle

Konz - - - - -	Konzentration
LPA - - - - -	Lektinassay-Puffer
MALT - - - - -	´mucosa associated lymphoid tissue´
Man - - - - -	Mannose
MG 1 - - - - -	´high molecular weight mucin glykoprotein´
MG 2 - - - - -	´low molecular weight mucin glykoprotein´
NeuAc - - - - -	Acetyl-Neuraminsäure
OD - - - - -	optische Dichte
PBI - - - - -	Papillen Blutungs Index
PBS - - - - -	Phosphatpuffer
PNA - - - - -	Peanut Agglutinin
PP - - - - -	Präpubertäre Parodontitis
Pr. - - - - -	Probe
PRP - - - - -	´proline rich protein´
QH - - - - -	Plaque-Index nach QUIGLEY and HEIN
RPP - - - - -	´rapid progressiv parodontitis´
S. - - - - -	Streptokokkus
SAG - - - - -	´saliva agglutinin´
S-HA - - - - -	´saliva coated hydroxyapatite
s-IgA - - - - -	Speichel-Immunglobulin A
SNA - - - - -	Sambucus nigra Agglutinin
spp. - - - - -	Subspecies
Std.Abw. - - - - -	Standard-Abweichung
Streptavidin-POD -	Streptavidin-Peroxidase
TMB-Gallati - - - -	Tetra Methyl-Benzidin-Gallati
TWEEN - - - - -	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
u.a. - - - - -	unter anderem
u.V. - - - - -	unter Vorbehalt
Verd. - - - - -	Verdünnung

VVA - - - - -	Vicia villosa Agglutinin
WGA - - - - -	Wheat Germ Agglutinin
z.B. - - - - -	zum Beispiel
z.T. - - - - -	zum Teil

8.5 Danksagung

Diese Arbeit entstand über einen Zeitraum von acht Jahren. Begonnen während des Studiums begleitete sie mich durch mein bisheriges Berufsleben. Allen, die in irgendeiner Form an dieser Dissertation mitgewirkt haben, gebührt mein Dank für ihre Geduld.

Besonders möchte ich an dieser Stelle Vera Sztankay für das gemeinsame wissenschaftliche Wirken während dieses achtjährigen Lebensabschnittes danken. Das parallele Vorantreiben unserer Dissertationen, der konstruktive Austausch und die gegenseitige Stärkung in labilen Phasen waren mir eine große Hilfe, die ich nicht missen möchte.

Ich bin allen Probanden außerordentlich zu Dank verpflichtet, dass sie mit ihrer Bereitschaft, Zeit für die Speichelabnahmen zu investieren und vor allem bewusst der Mundhygiene für neun Tage zu entsagen, diese Arbeit möglich gemacht haben.

Des Weiteren danke ich Petra Busse für die kompetente, initiative und liebenswürdige Unterstützung während des labortechnischen Teils dieser Studie.

Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Andreas Kage für die vielen Informationen, fruchtbaren Diskussionen und seine Kompetenz während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit bedanken.

Für die Mühen des Korrekturlesens, die Behebung technischer Computerprobleme und den stetigen Glauben an die Fertigstellung gilt mein besonderer Dank Dr. Markus Gloe.

Mein großer Dank aber gebührt vor allem Dr. Rainer Seemann für die Überlassung des Themas, die intensive freundschaftliche Begleitung und die kompetente wissenschaftliche Unterstützung bei dieser Arbeit, die er mir über einen so langen Zeitraum zuteil werden ließ.

Danke möchte ich auch im Besonderen meinen Eltern sagen, die mir während jeder Phase dieser Arbeit den Rücken stärkten.

Berlin im Februar 2005

Jessica Drews

8.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt wurde.

Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Jessica Drews